

***Einfluss der Mikroheterogenität in humanem
osteoarthrotischen Kniegelenkknorpel auf dessen katabole
und anabole Stimulierbarkeit durch Interleukin-1 β***

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Rico Ilgen,

geboren am 17. September 1976 in Schmalkalden / Thür.

Eisenberg / Thüringen (2006)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Rudolph A. Venbrocks (Eisenberg)
2. Prof. Dr. Dr. Gunter O. Hofmann (Jena)
3. Prof. Dr. Werner Hein (Halle-Wittenberg)

Die Arbeit wurde vom Rat der Medizinischen Fakultät
als Dissertation angenommen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Knorpel / Gelenkknorpel.....	2
1.1.1	Die Knorpelzelle	5
1.1.2	Die extrazelluläre Matrix.....	7
1.2	Osteoarthritis	14
1.2.1	Charakterisierung von Interleukin-1	15
1.3	Problemstellung und Ziel dieser Arbeit.....	16
2	METHODEN.....	17
2.1	Zellbiologische Methoden.....	17
2.1.1	Gewinnung und Kultivierung von Knorpelgewebe.....	17
2.1.2	Bestimmung des Gewichtes der Explantate nach Kultivierung	19
2.2	Biochemische Methoden	20
2.2.1	Papain - Gewebeverdau	20
2.2.2	DNA – Bestimmung (DNA – Assay).....	20
2.2.3	Glykosaminoglykan – Bestimmung (DMB – Assay)	21
2.2.4	Bestimmung von Gelatinasen in Sammelmedien (Zymographie).....	21
2.3	Berechnungsmethoden und Statistik.....	22
2.4	Histologische und immunhistologische Methoden.....	24
2.4.1	Anfertigen von Gefrierschnitten.....	24
2.4.2	Safranin O - Färbung	24
2.4.3	Immunhistologie	25
2.4.3.1	Charakterisierung des Antikörpers AB-1031.....	25
2.4.3.2	Doppelfärbung mit den Antikörpern AB-846 und AB-1031	26
2.4.3.3	Doppelfärbung mit den Antikörpern AB-CPII und AB-C2C	27

3	ERGEBNISSE	29
3.1	Explantatkultur I – Optimierung der Kultivationsmethodik (Ziel 1)	29
3.2	Explantatkultur II – basaler Stoffwechsel und IL-1 β (Ziel 2)	34
3.2.1	Einzeldarstellung der Glykosaminoglykangehalte	40
3.3	Mikroheterogenität	45
3.3.1	Safranin O - Färbung	45
3.3.2	Immunhistologie	46
3.3.2.1	Gegenüberstellung von gesundem Knorpel und OA-Knorpel	51
4	DISKUSSION	53
4.1	Methoden	53
4.2	Ergebnisse	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	MATERIALIEN	61
6.1	Puffer, Lösungen, Ansätze und Kulturmedien	61
6.2	Chemikalien für Zellkultur, Antikörper usw.	65
6.3	Laborgeräte, Instrumente	67
6.4	Verbrauchsmaterialien	68
6.5	Computersoftware	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69
8	ANHANG	83
8.1	Lebenslauf	83
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung	84

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	<i>Schematische Darstellung der Zonen des hyalinen Knorpels</i>	5
Abb. 2	<i>Die extrazelluläre Matrix (modifiziert nach [73])</i>	7
Abb. 3	<i>Struktur von Proteoglykanen (modifiziert nach [73])</i>	10
Abb. 4	<i>Charakterisierung AB-1031</i>	26
Abb. 5	<i>Explantat-DNA-Gehalt abhängig vom Medium</i>	29
Abb. 6	<i>Explantat-GAG-Gehalt abhängig vom Medium</i>	30
Abb. 7	<i>GAG-Gehalt (Explantat+Medium) abhängig vom Medium</i>	31
Abb. 8	<i>Vergleich DNA-Gehalt von Nullpunkten und Kontrollen</i>	32
Abb. 9	<i>Vergleich Feuchtgewichte von 14- bzw. 21-Tagesstanzen</i>	33
Abb. 10	<i>Vergleich DNA-Gehalte von 14- bzw. 21-Tagesstanzen</i>	34
Abb. 11	<i>Vergleich DNA-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen</i>	35
Abb. 12	<i>GAG-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen</i>	36
Abb. 13	<i>Gesamt-GAG-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen</i>	36
Abb. 14	<i>Gelatinezymographien ausgewählter Patienten</i>	38
Abb. 15	<i>GAG-Gehalte ausgewählter Patienten</i>	39
Abb. 16	<i>GAG-Gehalte aller Patienten (Einzeldarstellung, Methode a)</i>	41
Abb. 17	<i>GAG-Gehalte aller Patienten (Einzeldarstellung, Methode b)</i>	42
Abb. 18	<i>Korrelationsanalyse der Methoden a und b</i>	43
Abb. 19	<i>GAG-Gehalte der Patienten „A“ und „K“ (nach Methode a und b)</i>	44
Abb. 20	<i>Safranin O - Färbungen der Patienten „K“ und „A“</i>	45
Abb. 21	<i>Aggrekanssynthese und Abbau („Patient K“)</i>	47
Abb. 22	<i>Aggrekanssynthese und Abbau („Patient A“)</i>	47
Abb. 23	<i>Kollagensynthese und Abbau („Patient K“)</i>	49
Abb. 24	<i>Kollagensynthese und Abbau („Patient A“)</i>	50
Abb. 25	<i>Vergleich von gesundem und OA-Knorpel (Aggrekanstoffwechsel)</i>	52
Abb. 26	<i>Vergleich von gesundem und OA-Knorpel (Kollagenstoffwechsel)</i>	52
Tab. 1	<i>Einteilung von Kollagenen nach strukturellen Besonderheiten (aus [67])</i> ...	8
Tab. 2	<i>Struktur ausgewählter Glykosaminoglykane (modifiziert nach [67])</i>	12

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibody = Antikörper
ACC	Ascorbinsäure = Vitamin C
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic proteins
BSA	bovines Serum Albumin
CMGP	cartilage matrix glycoprotein
CMP	cartilage matrix protein
COMP	cartilage oligomeric protein
DMB	1,9 - Dimethylmethylenblau
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FG	Feuchtgewicht
FGF	fibroblast growth factor
FKS	fetales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
HAS	hyaluronan synthase
HCL	Chlorwasserstoffsäure
IL-1 β	Interleukin-1 β
ITS	synthetischer Mediumzusatz, bestehend aus Insulin, Transferrin, Selenium
kb	Kilobasen
MMP	Matrixmetalloproteinase
NSAID	non steroidal antiinflammatory drug = nichtsteroidales Antiphlogistikum
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Proteoglykan
PTH	Parathormon
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris- Borsäure – EDTA - Puffer
TBS	Tris - gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TEP	Totalendoprothese
TGF	tissue growth factor
TIMP	Tissue Inhibitor of MMP
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 EINLEITUNG

Bei etwa der Hälfte der 40jährigen Bevölkerung in Industriestaaten lassen sich röntgendiagnostisch Gelenkveränderungen nachweisen. Im Alter von 65 Jahren gibt es praktisch keinen Menschen mehr, der diese Veränderungen nicht zumindest in leichter Ausprägung aufweist [86]. Bei diesen im Röntgenbild sichtbaren Gelenkveränderungen handelt es sich vor allem um eine Höhenabnahme des Knorpelgewebes (Verminderung des röntgenologischen Gelenkspaltes) sowie um Veränderungen des darunter liegenden Knochens – von Sklerosierungen über Bildung von Knochenzysten und knöcherne Ausziehungen bis hin zu klinisch erkennbaren Fehlstellungen der betroffenen Gelenke [56]. Solche Veränderungen sind in vielen Fällen Symptome einer degenerativen Gelenkerkrankung – der Osteoarthritis (OA). Diese geht in fortgeschrittenem Alter mit einer überproportionalen Inzidenz einher und gilt bereits heute als häufigste altersassoziierte Erkrankung in Deutschland. Im Jahre 2002 beliefen sich in Deutschland die Kosten für die Behandlung degenerativer Erkrankungen des muskulo-skelettalen Systems auf etwa 15,6 Milliarden Euro [33].

Aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung des Menschen, durch die viele Fälle klinisch überhaupt erst in Erscheinung treten können, wird die OA in Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnen und dementsprechend noch höhere Kosten verursachen. Am weitesten häufigsten ist die Wirbelsäule degenerativ erkrankt. Bei den peripheren Gelenken rangiert die Osteoarthritis des Kniegelenkes (Gonarthrose) vor der des Schultergelenkes (Omarthrose) und des Hüftgelenkes (Coxarthrose) [86]. Schmerzen, Bewegungseinschränkung sowie Deformitäten oder gar Einsteifung im fortgeschrittenen Stadium bedingen einen erheblichen Verlust an Lebensqualität bei den Betroffenen. Neben den konservativen symptomatischen Therapien wie Schmerzbekämpfung und Entzündungshemmung sowie begleitender Krankengymnastik stehen gegenwärtig verschiedene operative Verfahren (z.B. Umstellungsoperationen) zur Verfügung, mit Hilfe derer das Fortschreiten der Erkrankung aber allenfalls nur verzögert werden kann. Als kausale Behandlung ist jedoch nach wie vor lediglich die Implantation von Teil- oder Totalendoprothesen anzusehen, da hierbei die Arthrose in der Tat beseitigt wird. Allerdings werden nicht nur der arthrotisch veränderte Knorpel sondern auch große Anteile der Gelenkbinnenstruktur unwiederbringlich entfernt. Moderne Prothesensysteme sind durchaus in der Lage, den Betroffenen Schmerzen zu nehmen, Beweglichkeit zurückzugeben und ein hohes Maß an Lebensqualität zu ermöglichen. Die Versorgung mit einem Kunstgelenk ist jedoch eine definitive Maßnahme, die neben ihren Vorteilen auch mit Nachteilen behaftet ist. Es herrscht allgemeine Übereinstimmung darüber, dass ein solcher Schritt, in Abwägung mit dem Beschwerdebild des Patienten, möglichst lange hinausgezögert werden sollte. Aus diesem Grund wird heutzutage

vor allem den schmerz- und entzündungshemmenden Medikamenten (so genannten NSAIDs) eine große Bedeutung in der Behandlung der Osteoarthrose zuteil. Allerdings sind selbst mit modernen NSAIDs leider oftmals nur unbefriedigende oder nur vorübergehende Beschwerdelinderungen zu erzielen. Zudem bestehen hinsichtlich des Ansprechens auf die Medikation von Patient zu Patient teilweise große Unterschiede. Angesichts dessen besteht einerseits großer Bedarf an Wirkstoffen, die in der Lage sind, einem möglichst großen Patientenkollektiv über möglichst lange Zeit ausreichende Beschwerdelinderung zu verschaffen. Andererseits strebt man nach Wirksubstanzen, welche es ermöglichen, das gegenwärtig praktisch unaufhaltsame Fortschreiten der Erkrankung zum Stillstand zu bringen oder gar eine Regeneration des geschädigten Knorpels und somit eine Heilung der OA herbeizuführen.

Voraussetzung für das Erreichen beider Ziele ist allerdings ein umfassendes Verständnis der sich im Knorpelgewebe abspielenden physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, an denen vermutlich eine Vielzahl von (Boten-)Stoffen und Regelmechanismen beteiligt ist.

1.1 Knorpel / Gelenkknorpel

Knorpel (cartilago) ist spezialisiertes Bindegewebe mesenchymalen Ursprungs, das verschiedene Funktionen im menschlichen Organismus erfüllt. Charakteristisch für Knorpel sind die im Vergleich zu anderen Geweben sehr niedrige Zelldichte und das Fehlen von Gefäßen (Avaskularität). Je nach Funktion unterscheiden sich Knorpel in der Zusammensetzung von Elementen der Grundsubstanz, Kollagenen und elastischen Fasern. Aufgrund der histologischen Unterscheidbarkeit spricht man von elastischem, hyalinem und von Faserknorpel [79]. Die bedeutendsten Eigenschaften von Knorpel sind die hohe Elastizität und Druckbeanspruchbarkeit. Grundsätzlich besteht Knorpelgewebe aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM ist Funktionsträger der Knorpel Eigenschaften und bildet den Hauptanteil des Gewebes. Die Zellen dienen vor allem der Produktion und Aufrechterhaltung der Knorpelgrundsubstanz. Gelenkknorpel gehört zur Gruppe des hyalinen Knorpels. Er erscheint transparent, schimmert bläulich-weiß und bedeckt in einer wenige Millimeter dicken Schicht den subchondralen Knochen in artikulierenden Gelenken [73].

Ein Gelenk setzt sich aus Knorpel, subchondralem Knochen, der Gelenkkapsel, bestehend aus stratum fibrosum und stratum synoviale, sowie der jeweils umgebenden Muskulatur zusammen [115]. Die innere Schicht der Gelenkkapsel (stratum synoviale) produziert die Gelenkschmiere (Synovia), die für eine nahezu reibungslose Gelenkbewegung essentiell ist.

Verschiedene stark Wasser bindende Makromoleküle machen den Gelenkknorpel zu einem ausgesprochen wasserreichen Gewebe. Bei mechanischer Kompression des Gelenkknorpels entweicht interstitielles Wasser aus der Knorpelmatrix in die Synovia und kehrt bei Entlastung des Gelenkes wieder in die Knorpelmatrix zurück. Mit dem Wasser gelangen auch Stoffwechselendprodukte, abgespaltene Fragmente der EZM und Ionen aus dem Knorpel heraus bzw. Nährstoffe, Ionen, regulatorische Peptide und Hormone in ihn hinein. Diese kontinuierliche Wasserbewegung ist somit als eine Art Pumpmechanismus zu verstehen, welcher einerseits die Ernährung der Chondrozyten gewährleistet und andererseits die Elimination von Abfallprodukten ermöglicht [69, 72].

Neben ihrer Eigenschaft als Gelenkschmiere, spielt die Synovia also auch eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Knorpelgewebes. Knorpelgewebe ist reich an Natrium- und Kaliumionen. Sie fungieren als Gegenionen der Sulfationen der Proteoglykane. In ungleichmäßiger Verteilung enthält Knorpel auch Kalziumionen, die zum Großteil Komplexe mit den Sulfationenresten der Proteoglykane bilden. Die Hauptaufgabe des Knorpels besteht in der Aufnahme und Verteilung von Belastungen. Adulter Gelenkknorpel ist das einzige Gewebe ohne vaskuläre, nervale oder lymphatische Versorgung [80].

Man kann das Gewebe grob in vier horizontale Zonen einteilen, die fließend ineinander übergehen. Unterschieden werden eine oberflächliche, mittlere und tiefe Zone sowie die Tidemark und die kalzifizierte Zone mit subchondralem Knochen. Unterschiede der einzelnen Zonen bestehen vor allem bezüglich der Morphologie der jeweils vorherrschenden Chondrozyten sowie der molekularen Zusammensetzung der EZM.

Oberflächliche Zone

Diese Zone entspricht etwa 10 bis 20 Prozent der Knorpeldicke [73]. Hier findet man vor allem abgeflachte Knorpelzellen, die in bis zu drei Schichten übereinander angeordnet sind. Diese Zellen machen weniger als zehn Prozent aller Chondrozyten aus und unterscheiden sich hinsichtlich der Produktion von Bestandteilen der EZM deutlich von anderen Knorpelzellen [8, 7]. Sie besitzen Eigenschaften, die an Makrophagen erinnern wie Antigenpräsentation, Abgabe reaktiver Sauerstoffspezies und Phagozytose [50, 42, 22]. Die Chondrozyten der oberflächlichen Schicht sind ausgesprochen empfindlich, reagieren beispielsweise stark auf Interleukin-1 [9, 41].

Gelenke sind nicht von einer Basalmembran umgeben. Es scheint, als diene die oberflächliche Knorpelschicht selbst als eine Art Basalmembran, um den Knorpel von umgebendem Gewebe und von Körperflüssigkeit zu trennen [80].

Mittlere und tiefe Zone

Die Zellen der mittleren Zone (etwa 40 bis 60 Prozent der Knorpeldicke) sind von runder Gestalt und in Säulen angeordnet. Ihre Morphologie und Anordnung entspricht damit im Wesentlichen den Chondrozyten der tiefen Knorpelzone (etwa 30 Prozent der Knorpeldicke) [73]. Die Zellen beider Schichten werden von Höfen einer so genannten territorialen Matrix umgeben, welche sich in ihrer Zusammensetzung von der interterritorialen Matrix unterscheidet [109]. Knorpelzellen dieser Art machen über 80 Prozent aller Chondrozyten aus und sind Hauptfunktionsträger des Knorpelgewebes. Alle extrazellulären Bestandteile, die man im Knorpel findet, werden von diesen Zellen produziert: Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Hyaluronsäure, spaltende Enzyme (hauptsächlich MMPs) [58].

Je nach Gelenk und der Lage im Gelenk findet man Chondrozyten sowohl einzeln im Knorpelgewebe verstreut als auch in Gruppen von zwei oder mehreren Zellen organisiert vor. Diese Knorpelzellgruppen werden als Chondrone bezeichnet [109]. Chondrone können als eine funktionelle Untereinheit innerhalb der Knorpelmatrix aufgefasst werden, die der Versorgung der Einzelzellen dient [98, 99].

Kalzifizierte Zone und Tidemark

Die tiefsten Knorpelzellschichten des Gelenkknorpels findet man eingebettet in eine kalzifizierte EZM, wo sie ein Übergangsgewebe zum darunter liegenden Knochen bilden [88]. Der Kalziumgehalt hier ist im Vergleich zu dem des Knochens gering, im Vergleich zum restlichen Knorpelgewebe und zum Blutplasma jedoch erheblich. Die kalzifizierte Zone, auch hypertrophe Zone genannt, dient der Vermeidung der Diffusion von Nährstoffen aus dem Knochen in den Knorpel.

Die Tidemark ist ein zellfreier, etwa 10µm breiter Bereich, der die kalzifizierte Zone von der darüber liegenden nichtkalzifizierten Zone trennt. Sie ist histomorphologisch erkennbar. Mit zunehmendem Alter beobachtet man eine Verlagerung der Tidemark in Richtung Knorpeloberfläche [87]. Die besonderen biomechanischen und physiologischen Eigenschaften des Knorpels werden hauptsächlich durch die Struktur und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bestimmt [80].

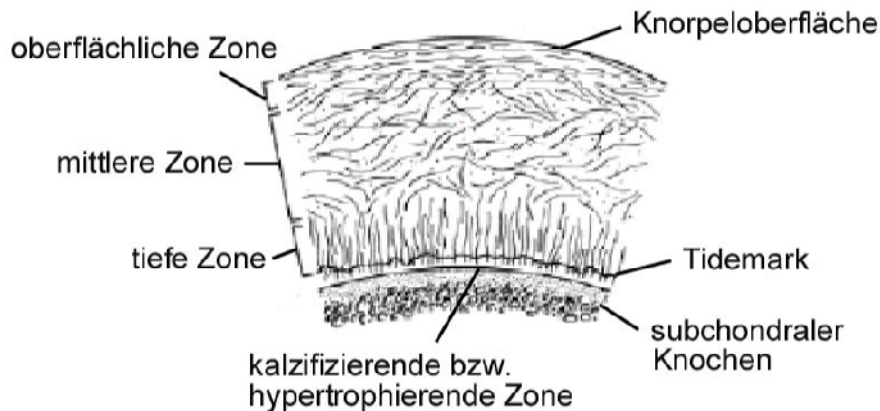


Abb. 1 *Schematische Darstellung der Zonen des hyalinen Knorpels (Vertikalschnitt, modifiziert nach [73])*

1.1.1 Die Knorpelzelle

Allein die Knorpelzellen (Chondrozyten) sind für die Bildung und Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix verantwortlich und somit essentiell für die Erhaltung des Gewebes. Sie stammen von einer mesenchymalen Differenzierungslinie ab und zeigen im ausdifferenzierten Gewebe nur eine geringe metabolische Aktivität [38]. Proliferation ist kaum nachweisbar [55]. Die Vorläuferzellen der Chondrozyten (Chondroblasten) teilen sich hingegen während ihres Wachstums. Durch die Abgabe von Grundsubstanz in die Umgebung weichen sie auseinander, so dass im ausdifferenzierten Knorpel die Zellen keinen Kontakt mehr miteinander haben und im Gewebe verstreut erscheinen [79].

Bezüglich ihres Energiestoffwechsels unterscheiden sich die Knorpelzellen deutlich von anderen Zellarten. So sind sie beispielsweise in der Lage, selbst in Gegenwart von ausreichend Sauerstoff ihren Energiebedarf mittels anaerober Glykolyse zu decken [61, 129]. Verglichen mit metabolisch sehr aktiven Zellarten wie Leber- oder Muskelzellen benötigen Chondrozyten nur etwa ein Viertel an Sauerstoff pro Zeiteinheit [45]. Es scheint, als bevorzugten Knorpelzellen leicht anaerobe Bedingungen. Diese Eigenschaft ist plausibel, wenn man bedenkt, dass aufgrund der eingeschränkten Glukosediffusion durch die EZM unterschiedliche Glukosekonzentrationen im Knorpelgewebe vorherrschen – hohe in den oberflächlichen Knorpelschichten und niedrige nahe der kalzifizierten Zone [80]. In Gegenwart der relativ hohen Glukosekonzentration der Synovialflüssigkeit betreiben die Chondrozyten anaerobe Glykolyse, was zur Reduktion des Sauerstoffverbrauches durch die oberflächlichen Knorpelschichten führt („Crabtree effect“) [90]. Dadurch steht den unteren Knorpelschichten mehr Sauerstoff für die aerobe Glukosespaltung zur Verfügung.

Aufgrund der unterschiedlichen ATP-Gewinnung aus aerober und anaerober Glykolyse, führt der „Crabtree effect“ zu etwa identischen Energieerträgen bei den Knorpelzellen der verschiedenen Schichten, trotz höchst unterschiedlicher Sauerstoff- und Glukoseversorgung [90].

Chondrozyten nehmen lediglich einen geringen Anteil des Knorpelgesamtvolumens im hyalinen Gelenkknorpel ein. Der chondrozytäre Differenzierungszustand wird durch eine Vielzahl von komplexen Interaktionen wie Zell-Matrix-Wechselwirkungen oder durch Gewebshormone und Wachstumsfaktoren erhalten. Dazu zählen Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie TGF- β (transforming growth factor- β) selbst und verschiedene BMPs (bone morphogenetic proteins) wie BMP-2 oder BMP-7 aber auch IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und PTH (Parathormon). Einige dieser Faktoren werden von den Chondrozyten selbst synthetisiert, z.B. TGF- β , andere hingegen aus der Zirkulation gebunden und in der EZM als Reservoir aus Zytokinen, Hormonen und Vitaminen angelegt [14].

Die Knorpelzellen des adulten Gelenkknorpels gelten als terminal differenziert und nicht mehr teilungsfähig [27], können jedoch unter pathologischen Bedingungen aktiviert werden. Unter in vitro Kulturbedingungen sind gravierende morphologische und biochemische Veränderungen der Chondrozyten zu beobachten [113]. Bei der Anzucht in Monolayerkultur nehmen die ursprünglich runden Knorpelzellen eine fibroblastoide und polygonale Gestalt an [46]. Außerdem kommt es zur Ausbildung fokaler Kontakte und Stressfasern. Dieser als Entdifferenzierung bezeichnete Modulationsprozess spiegelt sich auch in einem Umschalten von dem chondrozytenspezifischen (Typ II, IX, XI) auf ein fibroblastentypisches Kollagenmuster (I, III, V) wider [130]. Für die Beurteilung des Differenzierungszustandes von Knorpelzellen kann das Kollagen - Expressionsmuster als Marker genutzt werden. Die Entdifferenzierung ist maßgeblich von den Kulturbedingungen abhängig [114]. So begünstigen geringe Zelldichten die Entdifferenzierung, hohe dagegen erhalten den chondrozytären Phänotyp.

Kultivierte Zellen können außerdem in das Stadium der Hypertrophie eintreten [13]. Hypertrophe Chondrozyten produzieren Kollagen Typ X und finden sich physiologischerweise in fetalem Wachstumsknorpel, wo sie als irreversibel postmitotische Zellen schließlich via Apoptose absterben und von Knochenzellen ersetzt werden (enchondrale Ossifikation) [15].

Sowohl Entdifferenzierung als auch Hypertrophie lassen sich durch Zugabe bestimmter Chemikalien bzw. Hormone wie beispielsweise BMP, Bromdesoxyuridin oder Vitamin D induzieren. Die Kultivierung von Chondrozyten in bzw. über Gelmatrizen erhält deren „funktionellen“ Status, welcher sich anhand der Morphologie und der Expression knorpelspezifischer Kollagene nachweisen lässt [12].

1.1.2 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist eine Struktureinheit, die sich aus vielen Komponenten zusammensetzt. Dazu zählen Hauptbestandteile wie Kollagene, Glykosaminoglykane (GAGs), Glykoproteine (GPs) und Wasser. Außerdem spielen Ionen, Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren, z.B. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) sowie Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle [80]. Die Halbwertszeit der meisten Bestandteile der EZM ist außerordentlich lang, Wochen bis Monate bei den PGs, mehrere Jahre bis Jahrzehnte bei den Kollagenen [78, 93]. Die EZM kann auch als ein „Proteoglykan-Wasser-Gel“ betrachtet werden, in welches kollagene Fasern eingelagert sind. Die hochnegative Ladung der GAGs ermöglicht die Anlagerung von Wasser und bildet somit die Grundlage für die Elastizität, Druckresistenz und den Austausch von Nährstoffen und Metaboliten. Die kollagenen Fasern wirken dem Quellungsdruck entgegen, erlauben so nur rund 40 Prozent der maximal (ohne Kollagenfasern) möglichen Hydratation, so dass im Knorpel ständig die Tendenz zur Wasserbindung besteht [80]. Sie sind verantwortlich für die Integrität der Matrix bezüglich der darauf einwirkenden Druck- und Scherkräfte. Druckkräfte werden im Knorpel in Zugkräfte umgewandelt, die insbesondere auf die kollagenen Fasern wirken.

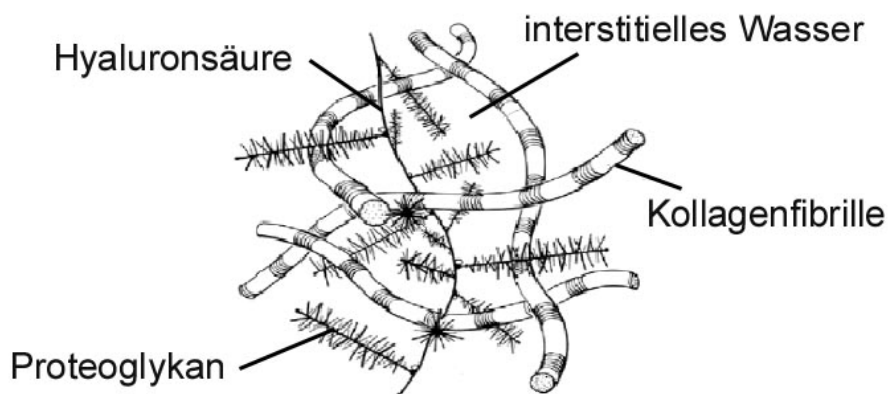


Abb. 2 Die extrazelluläre Matrix (modifiziert nach [73])

Kollagene

Kollagene sind Strukturproteine der EZM, die mindestens eine tripelhelikale Domäne besitzen [75]. Diese Proteinfamilie stellt mit 30 bis 50 Prozent den Hauptanteil der

Proteine von Vertebratenorganismen. Kollagene werden nach ihren Strukturmerkmalen in Gruppen eingeteilt, die nachfolgend mit den zugehörigen Kollagentypen aufgelistet sind.

Gruppe	Kollagentyp
1. fibrillenbildende Kollagene	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
2. FACITs (fibril-associated collagens with interrupted triple-helices)	IX, XII, XVI, XIX, XX, XXI
3. Netzwerkbildende Kollagene	IV, VIII, X
4. "beaded filament-forming collagen"	VI
5. Kollagene mit Transmembrandomäne	XIII, XVII, XXIII, XXV
6. Verankerungsfibrillenbildende Kollagene der Basalmembran	VII, XVII
7. MULTIPLEXINs (multiple triple helix domains and interruptions)	XV, XVIII
8. sonstige Typen	XXII, XXVI

Tab. 1 Einteilung von Kollagenen nach strukturellen Besonderheiten (aus [67])

Die entsprechenden Gene erstrecken sich über eine Länge von 40-50 kb Länge und bestehen aus bis zu 50 Exons und Introns [18]. Die Gene sind mindestens über 15 verschiedene Chromosomen verteilt. Kollagene setzen sich aus drei α -Ketten zusammen, die Homo- bzw. Heterotrimere bilden [59]. Die charakteristischen Gly-X-Y-Wiederholungen sind essentiell für die Ausbildung der Tripelhelix. Die Positionen X und Y werden in 30 Prozent der Fälle durch Prolin und Hydroxyprolin besetzt. Die Stabilität der Helix wird durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen erreicht. Kollagene durchlaufen eine Reihe posttranslationaler Modifizierungen wie Glykosylierungen, Hydroxylierungen, Ausbildung von Disulfidbrücken und proteolytische Prozessierung. Diese sind von besonderer Bedeutung für die Ausbildung supramolekularer Aggregate. Kollagene werden als Prokollagene sezerniert und extrazellulär durch die Abspaltung der N- und C-terminalen Peptide in funktionsfähige Moleküle umgewandelt [105].

Kollagene machen ungefähr ein Fünftel des Nassgewichtes von gesundem Knorpelgewebe aus. Mit etwa 90 Prozent ist Kollagen Typ II das am häufigsten vorkommende

Kollagen des hyalinen Knorpels. Es ist ein Homotrimer $[\alpha(\text{II})_3]$, bildet tripelhelikale Moleküle von 300nm Länge und kommt in Assoziation mit den Kollagenen Typ IX und XI als Mischfibrille vor [31]. Die quantitative Balance zwischen den Kollagentypen bestimmt die Größe und Form der Fibrillen. Die Kollagene Typ IX und XI kommen in geringen Mengen vor und spielen bei der Stabilität und der Vernetzung eine entscheidende Rolle [76]. Fibrillen dieser Kollagene vermitteln Zugfestigkeit und bilden ein Netzwerk, welches die großen Aggregate aus Aggrekanen, Linkproteinen und Hyaluronsäure zusammenhält [74]. Vertikale Fibrillen steigen von ihrer Verankerung in der kalzifizierten Zone aus auf und bilden ein Gewölbe unterhalb der oberflächlichen Zone. Vermutlich werden mit Hilfe der vertikalen Fibrillen Belastungen durch die Knorpelschicht hindurch in den subchondralen Knochen geleitet. Die Aufgabe der horizontal verlaufenden Fibrillen an der Gelenkoberfläche könnte sein, seitliche Scherkräfte, die bei der Gelenkbewegung auftreten, an das angrenzende Bindegewebe weiterzuleiten [80].

Kollagen Typ X wird ausschließlich in der hypertrophen bzw. kalzifizierten Zone, die sich unterhalb der Tidemark befindet, exprimiert. Dieses homotrimere Molekül besteht aus einer Tripelhelix, deren Länge ungefähr der Hälfte von denen klassischer fibrillenbildender Kollagene entspricht und acht Unterbrechungen in der Tripletstruktur aufweist [110]. Das Kollagen Typ X Molekül trägt an beiden Enden globuläre, nichtkollagene Domänen, die für die Ausbildung von hexagonalen Netzstrukturen essentiell sind [60]. Diese Netzwerke dienen als Template bei der enchondralen Ossifikation. Die Expression von Kollagen Typ X dient als Marker für den Übergang der Chondrozyten in das Stadium der Hypertrophie und somit deren terminale Umwandlung in sekundäre Ossifikationszentren [130]. Mit einem Anteil von weniger als zwei Prozent ist im Knorpelgewebe Kollagen Typ VI zu finden [30, 119]. Dieses auch in nichtknorpeligen Geweben weit verbreitete Kollagen konzentriert sich im Knorpel perizellulär, bildet ein eigenes Netzwerk und fungiert als Bindeglied zwischen der Chondrozytenoberfläche und der EZM [100, 97].

Glykosaminoglykane (GAGs) und Proteoglykane (PGs)

GAGs sind Polysaccharide mit sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die meist aus Aminosackern und Uronsäure bestehen. Die meisten Polysaccharidketten sind kovalent mit einem Coreprotein verknüpft, man spricht dann von Proteoglykanen [107]. PGs machen rund fünf Prozent des Nassgewichtes von gesundem Gelenkknorpel aus. Das mit etwa 90 Prozent hauptsächlich vorkommende Proteoglykan ist das Aggrekan [40]. Das Aggrekanmolekül besteht aus fünf unterschiedlichen Domänen, drei globulären und

zwei linearen. Der N-terminale Proteinanteil beginnt mit der G1-Domäne, die die Bindungsstelle für das Linkprotein trägt. Die G1-Domäne besitzt Oligosaccharidseitenketten und hochaffine Spaltstellen für MMPs. Die C-terminale G3-Domäne ist nicht glykosiliert und kann, genau wie die G1-Domäne, leicht von Metalloproteinasen abgespalten werden. Die linearen Domänen des Aggrekans tragen zahlreiche polysulfatierte GAGs wie Keratan-, Dermatan- und Chondroitinsulfat als Seitenketten. Diese hochsulfatierten GAGs tragen eine große negative Ladung, welche die Anlagerung von Gegenionen und Wasser bewirkt. Dieses Charakteristikum des Aggrekans vermittelt hauptsächlich den Schwelldruck des Knorpels [71]. Wie bereits erwähnt, wirken die Kollagenfasern ab einem bestimmten Hydratationsgrad einer weiteren Hydratation entgegen. Somit liegt die Wechselwirkung von Kollagen und PGs der hydromechanischen Eigenschaft von Knorpelgewebe zugrunde.

Ein besonderes Proteoglykan, das so genannte Lubricin oder *SZP* (superficial zone protein) wird von Chondrozyten der oberflächlichen Zone sezerniert. Es ähnelt in seiner Aminosäurezusammensetzung den Mukoproteinen, die vom Epithel des Gastrointestinaltraktes produziert werden. Anders als Mukoproteine besitzt es jedoch eine Keratansulfatseitenkette, was es einzigartig macht [111]. Außer in den Chondrozyten der oberflächlichen Knorpelzone wurde SZP lediglich in Synovialzellen und der Synovia gefunden. Damit ist anzunehmen, dass es eine Rolle bei der Gelenkschmierung spielt [80]. Die Feinabstimmung der Struktureigenschaften von Knorpelgewebe wird durch kleine PGs wie Decorin, Lumican, Biglykan und Fibromodulin bewerkstelligt [40, 107, 92].

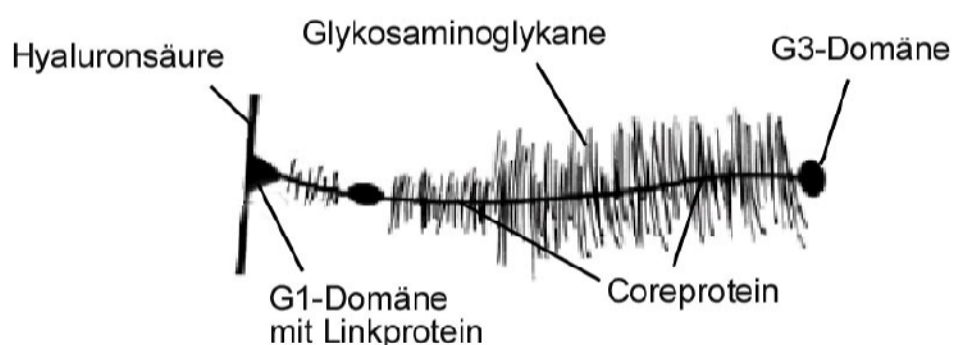
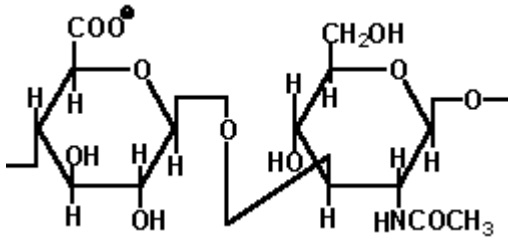
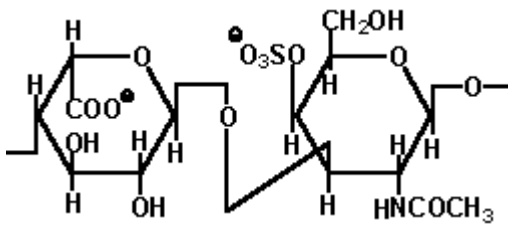
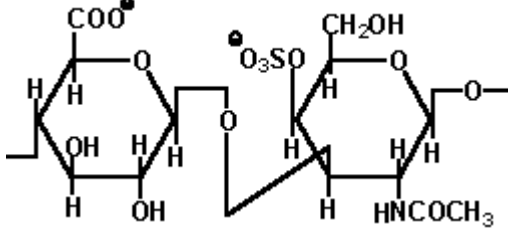
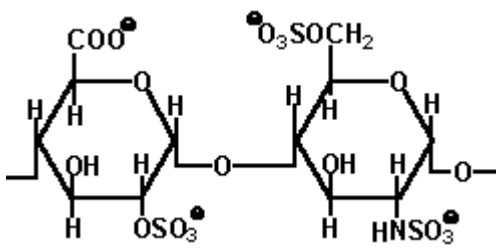
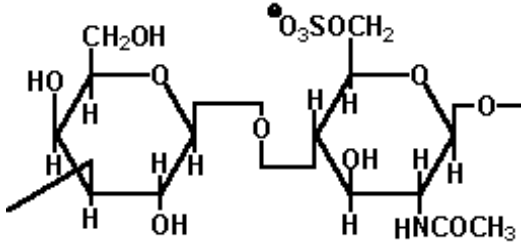


Abb. 3 Struktur von Proteoglykanen (modifiziert nach [73])

Neben den sulfatierten GAGs können im Knorpelgewebe auch nicht sulfatierte gefunden werden. Hyaluronsäure ist das bedeutendste nicht sulfatierte Glykosaminoglykan [64].

Es besteht aus mehreren 10 000 Glukose-Glukuronsäure-Einheiten und bindet über das stark hydrophobe Linkprotein die G1-Domäne der PGs [108, 84]. Beispielsweise können bis zu 100 Aggrekanmonomere so zu riesigen Aggregaten formiert werden [40]. Dadurch entstehen Aggregate mit Molekulargewichten von mehreren Megadalton. Derartige Riesenmoleküle können aufgrund ihrer Größe das umgebende Kollagenfasernetzwerk nicht verlassen und sind deswegen außerhalb des Knorpelgewebes nicht zu finden. Aus diesem Grund ist das Erscheinen von Fragmenten dieser Aggregate ein empfindlicher Indikator sowohl bezüglich des normalen Stoffumsatzes als auch pathologischer Vorgänge im Knorpel. Aufgrund des hohen Wasserbindungsvermögens und ihres rheodynamischen Verhaltens, wodurch sie eine nahezu reibungslose Gelenkbewegung ermöglicht [81], spielt die Hyaluronsäure auch bei der Gelenkschmierung eine wesentliche Rolle [80].

	<p>Hyaluronsäure besteht aus D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin</p> <p>Verknüpfung: $\beta(1 \rightarrow 3)$</p>
	<p>Dermatansulfat besteht aus L-Iduronsäure und N-Acetyl-D-Galaktosamin (beide vielfach sulfatiert)</p> <p>Verknüpfung: $\beta(1 \rightarrow 3)$</p>
	<p>Chondroitinsulfat besteht aus D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Galaktosamin (beide vielfach sulfatiert)</p> <p>Verknüpfung: $\beta(1 \rightarrow 3)$</p>

	<p>Heparin und Heparansulfat bestehen aus D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure und N-Acetyl- oder N-Sulfo-D-Glukosamin (vielfach sulfatiert)</p> <p>Verknüpfung: $\alpha(1 \rightarrow 4)$</p> <p>(Heparansulfat hat weniger Sulfate als Heparin)</p>
	<p>Keratansulfat besteht aus Galaktose und N-Acetyl-D-Glukosamin (vielfach sulfatiert)</p> <p>Verknüpfung: $\beta(1 \rightarrow 4)$</p>

Tab. 2 Struktur ausgewählter Glykosaminoglykane (modifiziert nach [67])

Glykoproteine

Obwohl diese Gruppe der Matrixkomponenten im Vergleich zu anderen einen mengenmäßig geringeren Anteil am Knorpel hat, sind Glykoproteine von enormer Bedeutung für die funktionellen Eigenschaften des Gewebes. Da viele GPs als Adhäsionsmoleküle fungieren, werden sie auch „Gewebezement“ genannt. GPs sind an der Regulation des chondrozytären Phänotyps beteiligt [80].

Glykoproteine wie COMP (cartilage oligomeric protein), Fibronectin, CMP (cartilage matrix protein), CMGP (cartilage matrix glycoprotein) sind auf verschiedene Weise an Zell-Matrix-Interaktion beteiligt. Chondrocalcin ist ein kalziumbindendes GP, welches nur in Knorpel vorkommt. Da es sich hierbei um das N-terminale Propeptid von Kollagen Typ II handelt, korreliert sein Vorkommen mit dem Kollagen Typ II - Stoffwechsel. Im Gegensatz zu anderen Prokollagenpeptiden wird es nicht abgebaut, sondern verbleibt als eigenständiges Strukturelement in der EZM [128, 96]. Das Glykoprotein Tenascin kommt in verschiedenen Bindegeweben in unterschiedlichen Isoformen vor. Seine dreidimensionale spinnenförmige Molekülgestalt legt die Vermutung nahe, dass es an der Vernetzung der EZM beteiligt ist. Im gesunden Knorpel kommt Tenascin perizellulär

vor. Im Arthroseknorpel hingegen ist es stark vermehrt und lagert sich auch in der übrigen EZM ab [44, 17].

Weitere Komponenten

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Bestandteile der EZM und gehören zur Familie der Zinkproteasen. Sie sind wesentlich für den normalen Matrixturnover, indem sie beispielsweise Kollagenfibrillen und Proteoglykanaggregate spalten. MMPs können in Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine und membrangebundene Metalloproteinasen unterteilt werden [80]. Kollagenasen spalten intakte Kollagentripelhelices einschließlich jener in supramolekularen Fibrillen. Die entstehenden Spaltprodukte sind thermisch instabil und verlieren ihre typische Helixstruktur. Gelatinasen können lediglich vorgespaltene und denaturierte Einzelkollagenpolypeptidketten spalten. Sowohl Kollagenasen als auch Gelatinasen sind in der Lage, auch andere Matrixbestandteile abzubauen. Substrate der Stromelysine sind beispielsweise Proteoglykane und andere (Glyko-) Proteine der EZM. Proteoglykanspaltprodukte können weder an Hyaluronsäure noch an andere Matrixbestandteile binden und gehen deshalb aus dem Knorpel verloren [80]. Die membrangebundenen MMPs werden als ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) bezeichnet und sind hauptsächlich am Abbau von Aggrekan, dem am häufigsten vorkommenden Proteoglykan, beteiligt [132].

Die Regulation der MMPs erfolgt durch Inhibitoren wie zum Beispiel durch TIMP (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases). Diese sind eine Gruppe stark basischer Polypeptide, die an Komponenten der EZM binden und somit eine exzessive Degradation verhindern. Mittlerweile sind verschiedene TIMP-Isoformen bekannt.

Interessanterweise sind solche Inhibitoren wie TIMP auch für die Anti-Angiogenität, d.h. die Eigenschaft des Knorpelgewebes das Einsprossen von Gefäßen zu verhindern, verantwortlich [80].

Die Matrix enthält außerdem eine Vielzahl extrazellulärer Ionen. Dazu gehören Kaliumionen, die als Gegenionen zu den vielen anionischen Gruppen der Proteoglykane fungieren. Kalzium kommt vor allem in der kalzifizierten Zone und im Übergang zum subchondralen Knochen vor. Weitere bedeutsame Komponenten sind Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone.

1.2 Osteoarthrose

Der Begriff Osteoarthrose (OA) beschreibt eine chronisch verlaufende, degenerative Gelenkerkrankung, die sowohl Veränderungen am Knorpel (Erweichung, Fissuren, Substanzverlust) als auch knöcherne Veränderungen (Sklerosierung, Zysten, Osteophyten) hervorruft [100, 94]. Grundsätzlich können Osteoarthrosen in einer primären und einer sekundären Form auftreten. Während den primären OAs keine erkennbare Ursache zugrunde liegt, sind die sekundären Formen vor allem auf mechanische Einflüsse (insbesondere Übergewicht, Überbelastung, Verletzungen, Fehlbildungen) zurückzuführen [24]. Der klinisch manifesten, symptomatischen Erkrankung geht eine oftmals jahrelange asymptomatische Phase voraus [95]. Während dieser kommt es allmählich zur Imbalance zwischen anabolen und katabolen Vorgängen im Knorpelgewebe. Letztlich überwiegt der Katabolismus, woraus schließlich irreversible Veränderungen der molekularen und biophysikalischen Eigenschaften resultieren [26]. Das bedeutendste Charakteristikum der OA ist der fortschreitende Verlust an Proteoglykanen, insbesondere des Aggrecans [122, 121]. Da dieses, wie bereits erwähnt, für die Eigenschaften von gesundem Knorpelgewebe von maßgeblicher Bedeutung ist, führt der Verlust durch die Verminderung des Wasserbindungsvermögens zur Reduktion der prallen Elastizität des Knorpels und damit zur Erweichung des Gewebes. Dieses ist der mechanischen Belastung nicht mehr gewachsen, wodurch weitere Schäden entstehen. Die Kollagen Typ II - Synthese sistiert, was aber aufgrund der langen Halbwertszeit von Kollagen nicht unmittelbar zum Verlust von Kollagen führt [80]. Jedoch verursachen gleichzeitig MMPs eine fortschreitende Zerstörung der Kollagenetzwerke, wodurch das Gewebe zusätzlich destabilisiert und noch anfälliger gegenüber mechanischen Belastungen wird [80]. Im Rahmen dieses Geschehens haben die Chondrozyten zu proliferieren begonnen, was im Spätstadium der Arthrose einerseits die Umwandlung in Knorpelzellen vom embryonalen Phänotyp (hypertrophe Chondrozyten) und andererseits die Entdifferenzierung zu atypischen, fibroblastoiden Zellen zur Folge hat. Wie schon erwähnt, exprimieren hypertrophe Chondrozyten charakteristischerweise Kollagen Typ X. Entsprechend der Funktion ihrer „physiologischen Pendanten“ während der Skelettentwicklung, führen die „pathologisch-hypertrophen“ Chondrozyten durch ihren programmierten Tod (Apoptosis) zur Entstehung von Kalzifikationszonen im Knorpelgewebe [49, 25]. Vermutlich ist dies die Erklärung für die beobachtete altersabhängige Verlagerung der Tidemark in Richtung Knorpeloberfläche und die Ausbildung der so genannten sekundären Ossifikationszentren im Knorpelgewebe [88, 2].

Die fibroblastoiden Chondrozyten produzieren die Kollagen Typen I und III sowie das Glykoprotein Fibronectin in großen Mengen. Das Netzwerk, das aus Kollagen Typ I und Fibronectin entsteht, unterscheidet sich jedoch grundlegend von dem ursprünglich vor-

handenen, vor allem in Bezug auf den Wassergehalt und die biomechanischen Eigenschaften [1]. Deshalb ist es lediglich ein minderwertiger Ersatz, der den funktionellen Anforderungen keinesfalls gerecht werden kann.

Der oft langjährige Verlauf der OA ist durch intermittierende Entzündungszustände der Synovia gekennzeichnet [39, 112]. Somit besitzt die degenerative Gelenkerkrankung OA eine entzündliche Komponente. Dieser Tatsache wird im anglo-amerikanischen Sprachraum durch die Bezeichnung der Osteoarthrose als „Osteoarthritis“ Rechnung getragen. Während der entzündlichen Phasen wird IL-1 vom Synovialgewebe in den Gelenkspalt abgegeben, von wo aus es in das Knorpelgewebe gelangt [28]. IL-1 gilt nach derzeitigem Verständnis als eine der wichtigsten Substanzen sowohl im Zusammenhang mit der OA als auch mit der rheumatoiden Arthritis [120].

1.2.1 Charakterisierung von Interleukin-1

Interleukine (IL) gehören wie Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF) zu einer großen Gruppe von Peptidfaktoren – den so genannten Zytokinen [123]. Zytokine können von verschiedensten Zellen freigesetzt werden und regulieren überwiegend als lokal wirkende Faktoren Wachstum, Differenzierung und Funktionszustände spezifischer Zellen und Gewebe. Insbesondere die Interleukine haben eine differenzierende und mitogene Wirkung auf ihre Zielzellen. Zunächst wurden lediglich weiße Blutzellen wie Lymphozyten und Makrophagen als Zielzellen von Interleukin identifiziert. Inzwischen sind eine Vielzahl von Zielzellen sowie viele IL-Subtypen bekannt [67]. Die Bindung der Zytokine an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen ist Voraussetzung für die Entfaltung ihrer Wirkung.

Auch auf der Oberfläche von Knorpelzellen wurden Interleukinrezeptoren identifiziert. Es handelt sich hierbei um so genannte CD 121-Rezeptoren (CD = cluster of differentiation), die eine spezifische Bindung mit IL-1 α und β ermöglichen. Über Bindung dieser Rezeptoren entfaltet IL-1 entsprechend der Vielzahl der Zielzellen eine Reihe von Wirkungen. Die katabole Wirkung von IL-1 auf gesunde Chondrozyten (verschiedener Spezies) ist durch zahlreiche Arbeiten belegt. Neben der Reduktion der Expression von anabolen Genen (beispielsweise der von Aggrecan und Kollagen Typ II) bewirkt IL-1 eine Verstärkung der Expression kataboler Gene (z.B. der Kollagenasen MMP-1, MMP-3, MMP-13 sowie der Aggrecanase ADAMTS-4) [65, 36, 10, 77, 124, 48]. Diese Effekte von IL-1 wurden nicht nur bei Kulturen mit isolierten Chondrozyten beobachtet, sondern auch bei Explantatkulturen mit gesundem humanen Knorpelgewebe nachgewiesen [28]. Sowohl die Effekte auf Chondrozytenkulturen als auch auf Explantatkulturen scheinen dabei dosisabhängig zu sein.

Demnach kommt es bei niedrigen Dosen zunächst zur Reduktion der Aggrekanssynthese, bevor es bei hohen IL-1 β - Dosierungen zur so genannten „chondrozytären Chondrolyse“ (d.h. Abbau der umgebenden Matrix durch Chondrozyten, Katabolismus) kommt [26, 11, 19]. Entsprechend der Kenntnis seiner Wirkung auf gesunde Chondrozyten, dient Interleukin-1 als Agens zur Induktion eines katabolen Stoffwechsels in unterschiedlichen Entzündungsmodellen.

Unterdessen bleibt die Rolle von IL-1 bei bereits geschädigtem, osteoarthrotischem Knorpel unklar. Fan und Mitarbeiter zeigten 2005, dass Interleukin-1 β bei isolierten Knorpelzellen, gewonnen von Patienten mit fortgeschrittener Arthrose, nicht in jedem Fall eine katabole Stoffwechsellaage induziert oder verstärkt [32]. Es scheint, als reagierten OA-Chondrozyten in heterogener Weise auf den vermeintlich katabolen Stimulus durch IL-1 β .

1.3 Problemstellung und Ziel dieser Arbeit

Vorrangiges Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses des Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) auf humanes osteoarthrotisches Knorpelgewebe (in vitro Explantatkultur). Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei die Effekte auf den Glykosaminoglykan- und den Kollagenstoffwechsel in Mikroumgebungen.

Dementsprechend ergeben sich folgende Teilaufgaben bzw. Ziele:

1. Optimierung eines in vitro Modells auf der Basis definierter Knorpelimplantate aus humanem arthrotischen Knorpel.
2. Untersuchung basaler Matrixstoffwechsellageparameter (Proteoglykan) zur Festlegung der anabolen bzw. katabolen Stoffwechsellaage mit und ohne IL-1 β Stimulus.
3. Untersuchung der Mikroheterogenität durch immunhistologische Analyse von Proteoglykan- und Kollagenauf- und Abbauprodukten.

2 METHODEN

2.1 Zellbiologische Methoden

Für zellbiologische Experimente ist es von entscheidender Bedeutung, dass sowohl das verwendete Instrumentarium als auch die eingesetzten Chemikalien steril sind und alle Arbeitsschritte unter keimfreier Atmosphäre durchgeführt werden. Viele verwendete Materialien, z.B. Pipetten, sind bereits steril verpackt erhältlich. Alles andere wurde entweder hitzesterilisiert (20min bei 121° Celsius), z.B. Pipettenspitzen, oder mit 70%igem Ethylalkohol desinfiziert, Stanzwerkzeuge oder Pinzetten beispielsweise. Zell-kulturmedien können weder hitzesterilisiert noch mit Alkohol behandelt werden. Um auch hier Keimfreiheit zu gewährleisten, wurden diese mit 0,2µm-Filtern steril filtriert und während der Kultivierung antibiotisch (durch Gentamycin) abgeschirmt.

2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von Knorpelgewebe

Für die Explantatkulturexperimente wurden zylindrische Knorpelstücke aus humanem Kniegelenksknorpel verwendet. Die Auswahl der Patienten, deren Knorpelimplantate in die Untersuchungen einbezogen wurden, erfolgte unabhängig von Geschlecht, Alter, Krankengeschichte bisheriger Medikation. Die Gonarthrose mit bestehender Indikation zur Knie-TEP, war zunächst einziges Kriterium, Knorpel des jeweiligen Patienten zu verwenden. Bei der Präparation der im Rahmen der TEP-Implantation entfernten Knorpelanteile (Tibiaplateaus, Anteile der Femurkondylen) stellte sich dann schließlich heraus, bei welchen Patienten genügend Material gewonnen werden konnte und bei welchen zu wenig „Restknorpel“ vorhanden war, um diesen für die Kulturexperimente zu verwenden. Somit wurde nur ein Teil der Patienten, von denen Material zur Verfügung stand, auch tatsächlich in die Untersuchungen einbezogen.

Die Knorpelzylinder (Explantate) wurden abhängig von der Verfügbarkeit und Beschaffenheit des Knorpels entweder von den Femurkondylen oder vom Tibiaplateau entnommen. Dies erfolgte unmittelbar nach Erhalt des Materials aus dem Operationssaal an einer sterilen Werkbank (Microflow Workstation, Nunc). Nach tangentialer Abtrennung der Knorpelschicht möglichst dicht über dem subchondralen Knochen mittels eines Skalpells, erfolgte die Entnahme der Explantatzylinder unter Verwendung einer Rundstanze mit einem Durchmesser von drei Millimetern. Neben den zur Inkubation vorgesehenen Knorpelstücken

wurden auch welche entnommen, die später als Nullkontrollen verwendet wurden. Diese Nullkontrollen bzw. Nullpunkte repräsentieren den Zustand des Gewebes vor Beginn der Kultivation, sozusagen zum „Zeitpunkt Null“. Alle Gewebeentnahmen wurden innerhalb bzw. so nahe der Hauptbelastungszone wie möglich vorgenommen, unter der Voraussetzung, dass dort zumindest noch Knorpel vorhanden war, der eine Schichtdicke von wenigstens 2mm aufwies. Wichtiges Charakteristikum war zudem eine deutliche Erweichung des Knorpels im Entnahmebereich als Zeichen der bestehenden Arthrose [24]. Die entnommenen Explantatzylinder wurden in eine mit dem Antibiotikum Gentamycin (500µg/ml) versetzte und auf 37° Celsius vorgewärmte PBS-Lösung verbracht und etwa 10 Minuten darin belassen. Anschließend wurden die zur Inkubation vorgesehenen Zylinder zwei Tage lang in einer mit fetalem Kälberserum (FKS) und Gentamycin (50µg/ml) versetzten Nährlösung vorinkubiert. Die Nullkontrollen wurden bei -21° Celsius eingefroren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kulturexperimente auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt, nachfolgend als Explantatkultur I und II bezeichnet. In den Kulturen von Explantatkultur I wurde das Gewebe von 10 Patienten inkubiert, die Inkubation der Explantate 15 weiterer Personen erfolgte in Explantatkultur II. Beide Varianten unterschieden sich außerdem hinsichtlich der Anzahl der entnommenen Explantatzylinder, der verwendeten Nährmedien und Zusätze sowie der Inkubationsdauer.

Explantatkultur I

Dem Knorpel jedes der 10 Patienten (Alter 55 bis 76 Jahre, Durchschnittsalter 69) wurden 10 Explantatzylinder entnommen. Acht von diesen (zufällig ausgewählt) wurden 21 Tage lang in vier unterschiedlichen Nährlösungen inkubiert (Doppelbestimmung), die restlichen zwei Zylinder dienten als Nullkontrolle. Grundlage jeder der vier verwendeten Nährlösungen war Dulbecco's Modified Eagles Medium® (DMEM). Diesem wurde entweder fetales Kälberserum (FKS) in einer Konzentration von fünf Prozent (= FKS-Medium) zugegeben oder aber ein synthetischer Zusatz (ITS) in drei unterschiedlichen Endkonzentrationen (1: 1000 = ITS1-Medium, 1: 10 000 = ITS2-Medium bzw. 1: 100000 = ITS3-Medium). Die zur Doppelbestimmung im gleichen Nährmedium inkubierten Explantate waren während der Inkubationsphase voneinander getrennt (separate Reaktionsräume).

Diese Kulturexperimente wurden durchgeführt, um eventuell unterschiedliche Einflüsse der verschiedenen Medien auf den Stoffwechsel der Knorpelimplantate zu testen. Außerdem sollten so mögliche methodische oder systematische Fehlerquellen identifiziert und beseitigt werden.

Explantatkultur II

Jedem der 15 Patienten (Alter 59 bis 79 Jahre, Durchschnittsalter 71) wurden vier Explantatzylinder zur Inkubation entnommen. Der die Entnahmestellen dieser Zylinder umgebende „Restknorpel“ wurde als Nullpunkt verwendet. Explantat und Restknorpel erinnern an Kern und Ring, so dass die Entnahmetechnik nachfolgend als „Ring-Kern-Methode“ bezeichnet wird. Charakteristikum dieser Methode ist es, dass jedem Explantatzylinder ein „individueller“, direkt angrenzender Nullpunkt zugeordnet ist. Zwei der vier entnommenen Knorpelimplantate eines Patienten wurden (zufällig) der Kontrollgruppe zugeordnet, die übrigen zwei der Versuchsgruppe (Doppelbestimmung, separate Inkubation). Für diese Kulturexperimente wurde ausschließlich ITS2-Medium verwendet. Das Knorpelgewebe der Kontrollgruppe wurde lediglich im Medium inkubiert, dem der Versuchsgruppe wurde zusätzlich IL-1 β in einer Konzentration von 10ng pro ml zugegeben. Die Inkubationsdauer betrug 14 Tage.

Alle Kultivationsexperimente wurden auf Platten im 96well Format durchgeführt. Dabei wurde jeder Explantatzylinder mit 200 μ l des jeweils verwendeten Nährmediums versetzt. Die Inkubationen wurden in einem Brutschrank (Memmert NCO2) durchgeführt. Darin herrschte eine konstante Temperatur von 37° Celsius, ein CO₂ – Gehalt von 5% sowie eine Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle verwendeten Medien wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Die dabei abpipettierten Medienüberstände wurden gesammelt, um die darin enthaltenen GAGs und MMPs bestimmen zu können. Bei jedem Mediumwechsel wurde den Nährmedien Ascorbinsäure (ACC) in der Konzentration 5 μ g/ml frisch zugegeben.

2.1.2 Bestimmung des Gewichtes der Explantate nach Kultivierung

Nach Abschluss der Inkubationen und Abpipettieren der Mediumüberstände wurden die noch tropfnassen Explantatzylinder kurz über saugfähiges Papier gerollt, um anhaftende Mediumreste abzutupfen. Danach erfolgte die Bestimmung des Gewichtes der nun nur noch feuchten Gewebestücke mit Hilfe einer Feinwaage (Satorius BP 121 S). Anschließend wurden die Knorpelimplantate mit einem Skalpell in vertikaler Richtung zweigeteilt. Der eine Teil des jeweiligen Explantatzylinders wurde (nach anschließendem Verdau des Gewebes) für biochemische Bestimmungen verwendet. Der andere Teil blieb der eventuellen Anfertigung von Gefrierschnitten vorbehalten und wurde eingefroren (siehe Kap. 2.5.1). Das Gewicht der für den Verdau vorgesehenen Knorpelstücken wurde ebenfalls bestimmt. Mit

den bis zu diesem Zeitpunkt tief gefrorenen Nullpunkten wurde auf die gleiche Weise verfahren, nachdem diese aufgetaut waren.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Papain - Gewebeverdau

Vorraussetzung für die nachfolgenden biochemischen Analysen der Gewebestücke, ist deren proteolytischer Aufschluss durch einen Gewebeverdau. Dafür wurde die Cystein-Protease Papain verwendet [134]. Das Enzym wurde in Papain-Puffer mit 5mM L-Cystein gelöst, so dass eine Endkonzentration von 125µg/ml resultierte. Jedes der zu verdauenden Gewebestücke wurde in einem Reaktionsgefäß mit 250µl dieser Lösung versetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 60° Celsius. Das so vorbehandelte Knorpelgewebe konnte für die anschließenden biochemischen Analysen verwendet werden.

2.2.2 DNA – Bestimmung (DNA – Assay)

Die Bestimmung der DNA-Menge in Knorpelgewebe erfolgte mit Hilfe eines zweistufigen fluorometrischen Assays unter Verwendung des Bisbenzimidazol-Farbstoffes Hoechst 33258 [53]. Diese Methode erlaubt die Bestimmung auch kleinster DNA-Mengen (5–10ng). Eine Aufreinigung der DNA ist nicht notwendig, da der Nachweis selbst in Anwesenheit störender Faktoren, z.B. Komponenten der extrazellulären Matrix, hochspezifisch ist. Das Prinzip dieser Messung ist die Erhöhung der Fluoreszenz des Farbstoffes durch dessen Interaktion mit DNA.

Zunächst wurde eine Standardkurve mit definierten DNA-Mengen (DNA aus Kalbsthymus) ermittelt, aus der man später die Konzentration der Proben bestimmen kann. Für die DNA-Bestimmung der papainverdauten Gewebestücke wurden zwischen 45 und 70µl des Gewebeverdaus mit PBS-Lösung vermischt, so dass immer ein Ansatz mit einem Volumen von 200µl resultierte. Jedem Ansatz wurden 1800µl Puffer zugegeben, welcher den Farbstoff Hoechst 33258 enthält. Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte in Plastikreagenzgläsern in einem Fluorometer (BIO – TEK Instruments SFM 25) bei einer Extinktion von 350nm und einer Emission von 450nm. Die DNA-Mengen der Proben wurden mit Hilfe der Standardkurve und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung errechnet.

Da die Kultivierungen als Doppelbestimmung durchgeführt wurden (zwei Explantate pro Medium) wurde schließlich noch der Durchschnitt beider Messwerte gebildet.

2.2.3 Glykosaminoglykan – Bestimmung (DMB – Assay)

Zur Messung des Glykosaminoglykangehaltes von zuvor enzymatisch aufgeschlossenem (Papain-Gewebeverdau) Knorpelgewebe wurde ein Verfahren verwendet, welches auf der metachromatischen Verschiebung der Absorption des Farbstoffes 1,9-Dimethylmethylenblau (DMB) in Gegenwart von negativ geladenen Gruppen, vor allem Sulfatgruppen, beruht. Da es sich bei Glykosaminoglykanen um Moleküle mit vielen negativen Ladungen handelt, eignet sich diese Methode als spezifischer Nachweis.

Chandrasekhar et al. [16] etablierten 1987 ein System zur Messung von GAGs im 96well-Format, welches zur GAG-Bestimmung in dieser Arbeit verwendet wurde. Demzufolge wird zunächst eine Lösung mit bekanntem Glykosaminoglykangehalt (DMB-Standard) in unterschiedlichen Konzentrationen in die Vertiefungen der Reihen A und H (Doppelbestimmung) einer 96well-Platte pipettiert. Als Nullkontrolle wird Na-Acetat-Puffer verwendet. Die unbekannten Proben werden jeweils in verschiedenen Verdünnungen in die übrigen Vertiefungen der 96well Platte gegeben (Mehrfachbestimmungen). Das Volumen der Proben mit bekanntem GAG-Gehalt in den Reihen A und H der Platte und das der zu bestimmenden Proben beträgt dabei immer 50µl. Zu allen Proben werden jeweils noch 15µl Guanidinium-HCl sowie 200µl des DMB-Farbstoffes gegeben. Fünf Minuten später erfolgt schließlich die Messung der Absorption durch die einzelnen Proben in einem Microplate-Reader (Biorad Modell 55). Dafür wird Emissionslicht der Wellenlänge 525nm eingesetzt. Anhand der Absorption der Proben mit bekannten GAG-Konzentrationen wird eine Standardkurve bestimmt, mit deren Hilfe der GAG-Gehalt der unbekannten Proben (unter Berücksichtigung der Verdünnungen) errechnet wird.

Zur Steigerung der Messgenauigkeit wurden wie erwähnt von jeder Probe mehrere Ansätze in unterschiedlicher Verdünnung gemessen. Nur diejenigen Ansätze, deren Absorptionsmesswerte dem linearen Bereich der Standardkurve entsprachen, wurden verwendet, um einen Durchschnittswert zu bilden.

2.2.4 Bestimmung von Gelatinasen in Sammelmedien (Zymographie)

Die Gelatinezymographie ist ein Verfahren zum Nachweis der Gelatinaseaktivität [21]. Gelatinasen gehören zur Familie der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs). Diese werden von Knorpelzellen synthetisiert, sind im Knorpelgewebe vorhanden und werden während der Kultivierung vom Nährmedium aus dem Knorpelgewebe ausgewaschen. Die Gelatinezymographie dient dem Nachweis der MMP-2 und -9 sowie deren Proformen, da nur diese beiden Proteinase Gelatine abbauen können, also Gelatinasen sind.

Zunächst erfolgt die Auftrennung der Medienüberstände durch Anlage eines elektrischen Feldes (Elektrophorese). Die Separation der Proteine im Polyacrylamidgel beruht auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten, welches von Größe, Form und elektrischer Ladung der Moleküle abhängig ist. Das Gel enthält Gelatine als Substrat für die MMP-Fixierung. Der Elektrophorese schließt sich die Equibrilation in einem speziellen Puffer an. Über Nacht erfolgt nun die Inkubation in einem weiteren Puffer bei 37° Celsius in einem Bakterenschüttler (UNIMAX 1010). Die Temperatur ist für die optimale Enzymaktivität notwendig. Durch die Behandlung mit Coomassie® Brilliantblau werden nur Bereiche angefärbt, die Protein enthalten. An den Stellen, an denen MMP-Banden liegen, findet keine Farbbindung statt, da dort die Proteasen die Gelatine abgebaut haben. Mittels eines Proteinmarkers und der Position der hellen Banden vor dunkelblauem Hintergrund lässt sich die Identität der MMPs ermitteln. Die Auswertung erfolgt mittels einer Geldokumentationsanlage.

nach folgendem Protokoll wurden die Zymographien durchgeführt:

- ▶ einen Tag zuvor: Gießen der Gelatine-Gele
- ▶ am nächsten Tag: Elektrophorese bei 30mA
Auftragung: 1:1 Gemisch von Probe und zweifach Ladepuffer
- ▶ 30min in Equibrilationspuffer
- ▶ Waschen mit destilliertem Wasser
- ▶ Inkubation über Nacht bei 37° Celsius in Inkubationspuffer
- ▶ Waschen mit destilliertem Wasser
- ▶ Färbung mit Coomassie® Brilliantblau
- ▶ Entfärbung mit destilliertem Wasser
- ▶ Dokumentation der Ergebnisse

2.3 Berechnungsmethoden und Statistik

Da bei allen Kultivationsexperimenten immer zwei Explantate eines Patienten unter der gleichen Kulturbedingung inkubiert wurden (Doppelbestimmung), wurden aus den jeweiligen Messwerten zunächst die Durchschnittswerte ermittelt. Anschließend wurden diese, unter Berücksichtigung des Volumens der zum Verdau verwendeten Papainlösung, auf die Feuchtgewichte der betreffenden Explantate bezogen. Zur Bestimmung der Menge der in die Nährmedien abgegebenen GAGs, wurden die abpipetierten Überstände bei den

Medienwechseln gesammelt. Anhand der bekannten Gewichte der Explantate und Volumina der Medien wurden auch hier die GAG-Messwerte auf das Explantatfeuchtgewicht bezogen. GAG-Werte werden somit in dieser Arbeit stets in μg pro mg Feuchtgewicht ($\mu\text{g}/\text{mg}$ FG) angegeben und DNA-Werte in ng pro mg Feuchtgewicht (ng/mg FG).

Statistische Vergleiche erfolgten, nach vorheriger Prüfung der Werte auf Normalverteilung, unter Anwendung des student t-tests. Ergebnisse (p) kleiner als 0,05 galten als statistisch signifikant. Die Darstellungen der Standardabweichungen von Mittelwerten beziehen sich jeweils auf das 95 Prozent Vertrauensintervall. Die durchgeführte Korrelationsanalyse (siehe Kap. 3.2.1) wurde nach dem Verfahren von Spearman erstellt.

In Kapitel 3.2.1 (Methode b, vgl. Bild 15) werden für die Versuchsgruppen GAG-Werte angegeben, die keine Messwerte sind, sondern berechnet wurden. Sie entstanden unter Einbeziehung der GAG-Gehalte von Explantaten und den jeweils zugehörigen Nullpunkten. Dabei wurden die gemessenen GAG-Gehalte der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppe als Prozentwerte der GAG-Gehalte der entsprechenden Nullpunkte berechnet. Durch Differenz dieser Werte wurde der prozentuale Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe bezüglich einer Glykosaminoglykanzu- oder abnahme ermittelt. Aufgrund dieser Differenz ergaben sich, ausgehend vom absoluten GAG-Gehalt der Explantatzylinder der Kontrollgruppe, die (theoretischen) GAG-Werte für die Explantate der Versuchsgruppen. Das folgende Rechenbeispiel veranschaulicht die Verfahrensweise:

Beispielpatient	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
GAG-Nullpunkt (NP)	11,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$	9,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$
GAG-Explantat (EX)	3,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$	5,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$
GAG-Verlust NP-EX	67,8 %	39,4 %

relative GAG-Zunahme in der Versuchsgruppe : **67,8% - 39,4% = 28,4 %**

ausgehend vom gemessenen GAG-Wert

der Kontrollgruppe:

$$3,8\mu\text{g}/\text{mg} + 28,4\% = 4,88\mu\text{g}/\text{mg}$$

4,88 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ist somit der theoretische GAG-Gehalt des Explantatzylinders der Versuchsgruppe bei Einbeziehung der GAG-Gehalte der Nullpunkte und unter Berücksichtigung der relativen GAG-Gehaltsänderung (im Beispiel +28,4%).

2.4 Histologische und immunhistologische Methoden

Hierbei handelt es sich um Techniken zur Darstellung mikroskopischer Gewebestrukturen durch den Einsatz von Farbstoffen bzw. von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern.

2.4.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Zunächst wurden die Knorpelgewebstücke in einer räumlichen Orientierung, welche einen späteren vertikalen Schnitt durch das Gewebe ermöglicht, in TissueTek® eingefroren und bei -21° Celsius gelagert. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Gefrierschnittmikrotoms (Leica CM 1100) bei einer Temperatur von -28° Celsius. Die Schnittdicke betrug etwa 5µm. Die entstandenen Gewebeschnitte wurden auf SuperFrost® - Objektträger verbracht und bei 60° Celsius kurz angetrocknet. Die jeweiligen Färbungen erfolgten frühestens 24 Stunden später.

2.4.2 Safranin O - Färbung

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine Standardmethode in der Histologie von Knochen/Knorpel-Präparationen [106]. Safranin ist ein basischer Farbstoff, der kovalente Bindungen mit den negativen Ladungen der GAGs eingeht, so dass diese im gefärbten Gewebsschnitt schließlich rot erscheinen. Kollagene werden mit Lichtgrün gegengefärbt, erscheinen also grünlich im Präparat.

Die Gefrierschnitte werden zunächst für acht Minuten in einem Bad mit Safraninlösung inkubiert. Anschließend wird der nicht gebundene Farbstoff mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen. Nun erfolgt die zehnminütige Gegenfärbung mit Lichtgrün und wiederum die Entfernung von nicht gebundenem Farbstoff durch destilliertes Wasser. Die Färbung des Schnittes ist damit abgeschlossen, jedoch muss das im Gewebeschnitt noch enthaltene Wasser entfernt werden. Dies geschieht durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 bis 96%), durch die das Präparat geführt wird, bevor es für etwa 10min in Xylol getaucht bleibt. Direkt vom Xylolbad aus erfolgt schließlich die Eindeckung mit Canada-Balsam® unter Vermeidung von Luftblasen.

2.4.3 Immunhistologie

Immunhistologische Färbungen sind Verfahren, welche zur Auffindung von geringsten Substanzmengen geeignet sind. Prinzip dieser Methode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Moleküle (antigene Determinanten) der zu bestimmenden Strukturelemente hochselektiv bzw. hochspezifisch von Antikörpern (primäre Antikörper = Erstantikörper) gebunden werden. Die Sichtbarmachung erfolgt mittels eines Zweitantikörpers (sekundärer Antikörper), welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Da dieser Zweitantikörper hochselektiv an den Erstantikörper bindet, werden bei Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge die vom Erstantikörper „erkannten“ Strukturen mikroskopisch sichtbar.

Mit dieser Methode erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von neu synthetisiertem Aggrekan (am häufigsten vorkommendes PG) bzw. Prokollagen, sowie von Aggrekan- und Kollagenfragmenten als Korrelat der Proteoglykan- und Kollagenspaltung. Die immunhistologischen Färbungen wurden als Doppelfärbungen angefertigt. Dies bedeutet, dass in einem Gewebeschnitt zwei verschiedene antigene Determinanten mit Hilfe verschiedener Erst- und Zweitantikörper gleichzeitig sichtbar gemacht werden, wobei am Ende synthese-spezifische Antigene stets grün und degradationsspezifische Antigene immer rot markiert sind.

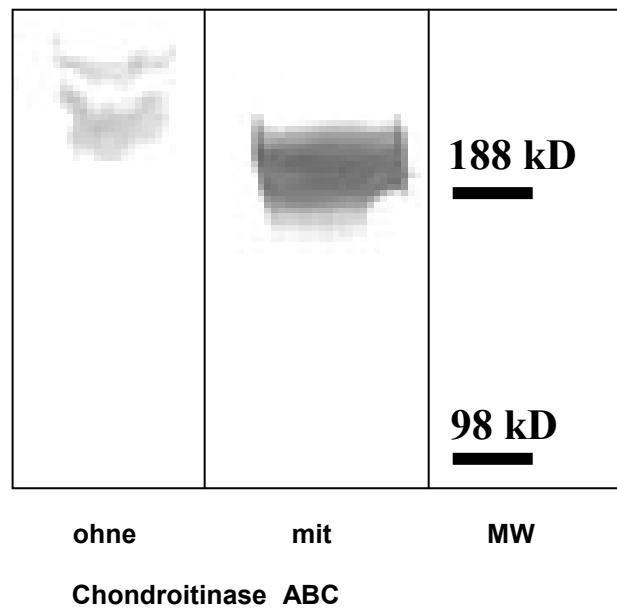
Die zu verwendenden Schnitte wurden luftgetrocknet, sind nicht älter als eine Woche und bei einer Temperatur von 4° Celsius aufbewahrt worden.

2.4.3.1 Charakterisierung des Antikörpers AB-1031

Es handelt sich hierbei um einen kommerziellen polyklonalen Antikörper (rabbit anti-aggrecan IgG, Fa. Chemicon International), der zum Nachweis von Maus-Aggrekan entwickelt wurde. Über die Nachweisbarkeit von niedermolekularen Fragmenten in adultem, humanem Knorpel (Aggrekanfragmente) werden seitens des Herstellers keine Angaben gemacht. Die antigene Determinante von AB-1031 ist in Knorpelgewebe, das durch erhöhten Stoffumsatz gekennzeichnet ist (z.B. fetaler Wachstumsknorpel) frei zugänglich, während die entsprechende Peptidsequenz in adultem Knorpel durch GAG-Seitenketten maskiert ist. Wir verwendeten AB-1031 auf humanem Knorpelextrakt, der zuvor mit dem chondroitinsulfatspaltendem Enzym Chondroitinase ABC behandelt wurde. Wie aus **Abbildung 4** hervorgeht, gelingt auf diese Art die Darstellung von humanem Aggrekan bzw. von partiell degradiertem Aggrekan. Somit konnte der Antikörper AB-1031 in der immunhistologischen Darstellung des Aggrekanstoffwechsels verwendet werden.

Abb. 4 Charakterisierung AB-1031

Ausschnitt der relevanten Banden eines Western-Blots unter Einsatz des Antikörpers AB-1031 auf Extrakten von humanem Gelenkknorpel. Links: ohne Behandlung mit Chondroitinase ABC, Mitte: mit vorheriger Chondroitinasebehandlung. Die Bande im Bereich von 188 kD entspricht teilweise degradiertem Aggrecan. AB-1031 ist somit zum Nachweis von Aggrecanfragmentation bei humanem Knorpelgewebe geeignet. MW = Molekulargewicht.

**2.4.3.2 Doppelfärbung mit den Antikörpern AB-846 und AB-1031**

Diese immunhistologische Färbung dient der Darstellung von Bereichen im Knorpelschnittpräparat, in denen Aggrecanneusynthese abläuft (primärer Antikörper AB-846) sowie von Bereichen, die durch Aggrecanabbau gekennzeichnet sind (primärer Antikörper AB-1031). Die antigene Determinante des Antikörpers AB-846 ist das Chondroitinsulfat-Epitop 846 [116]. Dieses ist in der globulären Domäne des Aggrecans lokalisiert. Da die globuläre Domäne im Rahmen der posttranslationalen Modifikation abgespalten wird, ist sie charakteristisch für neu synthetisiertes Aggrecan. Bei dem Epitop 1031 als antigene Determinante von AB-1031 handelt es sich um ein Epitop, das bei humanem Knorpelgewebe erst durch Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC freigelegt wird. Wie zuvor erläutert, entspricht der Nachweis von Epitop 1031 dem Vorhandensein von Aggrecan-spaltprodukten.

Um sie zu fixieren, wurden die luftgetrockneten Knorpelschnittpräparate zunächst mit 4%iger Paraformaldehydlösung (pH 7.2) 5min lang benetzt. Die Gewebeschnitte wurden dann über Nacht bei 4° Celsius mit dem Antikörper AB-846 inkubiert, der zuvor 500-fach in Albumin-Trispuffer verdünnt wurde. AB-846 stammt aus Mäusen und gehört der Gruppe G der Immunglobuline an.

Nun erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen eine dreistündige Inkubation mit dem Zweitantikörper, der spezifisch den Fc-Teil von AB-846 (Fluoreszein anti-mouse IgG) bindet.

Es handelt sich hierbei um einen Antikörper, welcher von Ziegen stammt und mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt wurde. Dieser Zweitantikörper wurde zuvor 100-fach in Albumin-Trispuffer verdünnt.

Damit AB-1031 mit dem entsprechenden Epitop im Gewebeschnitt präzipitieren kann, musste der Schnitt mit Chondroitinase ABC (1mg/ml PBS) 20min lang bei 37° Celsius angedaut werden. Die bestehenden Verbindungen zwischen AB-846, dem davon erkannten Epitop und dem Zweitantikörper bleiben dabei erhalten.

Nun erfolgte die Inkubation mit AB-1031 (Verdünnung 44-fach in Albumin-Trispuffer) für sechs Stunden bei Raumtemperatur und abgedunkelten Bedingungen. Der vom Kaninchen stammende Antikörper AB-1031 gehört zur Immunglobulin G - Familie.

Anschließend wurde der Schnitt mit dem entsprechenden Zweitantikörper (Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG, Verdünnung 200-fach in Albumin-Trispuffer) für drei Stunden im Dunkeln inkubiert. Dieser Zweitantikörper ist mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt.

Zwischen den beschriebenen einzelnen Schritten mussten jeweils ausgiebige Waschungen der Schnittpräparate mit PBS (5 x 5min) erfolgen, um Verunreinigungen bzw. nicht präzipitierte Antikörper, die sonst artefizielle Fluoreszenzen verursachen würden, zu entfernen. Nach Inkubation mit dem letzten Zweitantikörper wurde das Präparat nochmals gründlich mit PBS sowie mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Trocknung erfolgte schließlich die Eindeckung mittels ProLong®Antifade-Kit zur Fixierung des Präparates.

24 Stunden später wurden die Gewebeschnitte fluoreszenzmikroskopisch beurteilt und photographisch dokumentiert. Unter Anregung mit Licht entsprechender Wellenlängen kam es in Regionen verstärkter Aggrekansynthese bzw. verstärkter Aggrekanfragmentation zu einer grünen bzw. roten Fluoreszenz.

2.4.3.3 Doppelfärbung mit den Antikörpern AB-CPII und AB-C2C

Bei dieser Färbemethode erfolgt einerseits die visuelle Darstellung von Prokollagen Typ II mit Hilfe des Antikörpers AB-CPII. Durch den Nachweis von Prokollagen Typ II kann indirekt auf die Synthese von Kollagen Typ II geschlossen werden, da dieses durch Modifizierung des Prokollagens entsteht. Zum anderen werden im Gefrierschnitt gleichzeitig auch Bereiche sichtbar gemacht, in denen eine Kollagenspaltung erfolgt (AB-C2C).

Das Epitop CPII, die antigene Determinante von AB-CPII, ist auf dem C-terminalen Propeptid des Prokollagens Typ II lokalisiert [70]. Dieses Propeptid wird während der post-translationalen Modifikation unmittelbar nach der Synthese des Prokollagens abgespalten, wodurch aus Prokollagen Kollagen Typ II entsteht. Somit ist Epitop CPII ein spezifischer Indikator für neu synthetisiertes Kollagen Typ II. Das Neoepitop C2C (COL2-3/4C(long))

entsteht bei der Kollagen Typ II - Degradation durch die MMP-1. Der Nachweis durch den entsprechenden Antikörper AB-C2C ist somit charakteristisch für Kollagenspaltung [20].

Nach 5min Fixierung der Knorpelschnittpräparate mit 4%iger Paraformaldehydlösung und Waschen in PBS-Lösung (pH 7,2, 5 x 5min) wurden sie 90min lang bei 37° Celsius mit Chondroitinase ABC (1mg/ml) behandelt. Nach erneutem Waschen in PBS-Lösung wurden beide Erstantikörperlösungen (AB-CPII und AB-C2C) nach 100-facher Verdünnung in Albumin-Trispuffer gleichzeitig auf die Gewebeschnitte gegeben. Über Nacht erfolgte nun die Inkubation bei 4° Celsius. Nach nochmaligem Waschen (5 x 5min in PBS) wurden beide mit grünem bzw. rotem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörper (Alexa Flur 488 anti-rabbit IgG bzw. Alexa Flur 594 anti-mouse IgG, nach 100-facher Verdünnung in Albumin-Trispuffer) gemeinsam aufgetragen und drei Stunden lang bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach abschließendem sorgfältigem Waschen in PBS-Lösung und destilliertem Wasser erfolgte die Eindeckung mittels ProLong®Antifade-Kit. Bei der mikroskopischen Betrachtung am nächsten Tag erschienen je nach Anregungslicht Bereiche mit Kollagen Typ II - Synthese bzw. Bereiche mit Kollagenabbau entsprechend grün bzw. rot fluoreszierend.

3 ERGEBNISSE

3.1 Explantatkultur I – Optimierung der Kultivationsmethodik (Ziel 1)

Acht Explantatzylinder von 10 Patienten wurden in vier unterschiedlichen Nährmedien (FCS, ITS1, ITS2 und ITS3) 21 Tage lang inkubiert – jeweils zwei Explantatzylinder pro Medium (Doppelbestimmungen).

DNA – Gehalt

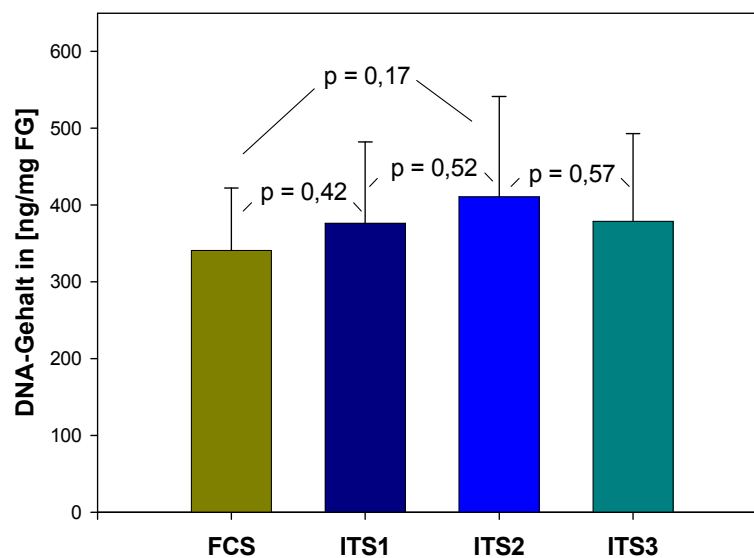


Abb. 5 *Explantat-DNA-Gehalt abhängig vom Medium*

Durchschnittlicher DNA-Gehalt in [ng/mg FG] (+ Standardabweichungen) der in den vier Medien inkubierten Explantatzylinder (n=20 pro Medium). p = Ergebnisse der student t-tests.

Abbildung 5 zeigt die durchschnittlichen DNA-Gehalte (mit Standardabweichungen) der Knorpel-explantate der 10 Patienten (n=80) nach Kultivierung in den verwendeten Nährmedien. Die t-Tests zwischen den Werten für die einzelnen Medien, deuteten auf keine relevanten Unterschiede zwischen den vier Medien bezüglich der DNA-Werte der Explantate hin (vgl. p-Werte > 0,05 in Bild 5). Somit konnten die erhobenen Daten unabhängig vom verwendeten Medium als eine zusammenhängende Datenmenge angesehen werden (vgl. Abbildungen 8 und 10).

Glykosaminoglykangehalt

Auch in Bezug auf die GAG-Messungen ergaben sich zwischen den vier Medien keine signifikanten Unterschiede (vgl. p-Werte in **Abbildung 6**). Das dort gezeigte Diagramm wurde anhand der Glykosaminoglykanbestimmungen der insgesamt 80 Explantatzylinder nach 21tägiger Kultivation erstellt. Es stellt den durchschnittlichen GAG-Gehalt mit Standardabweichungen der Knorpelimplantate der 10 Patienten für jedes der Nährmedien dar.

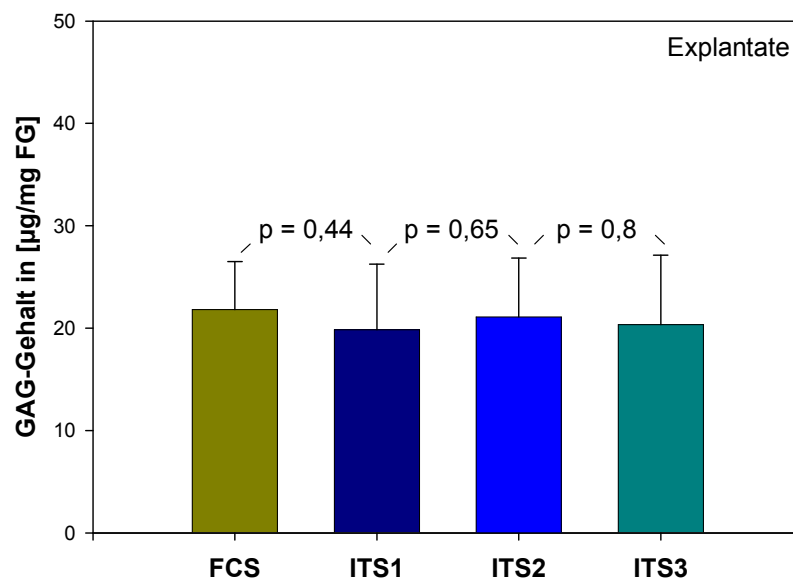


Abb. 6 Explantat-GAG-Gehalt abhängig vom Medium

Durchschnittliche GAG-Gehalte [µg/mg FG] (+ Standardabweichungen) der über 21Tage in verschiedenen Nährmedien (FCS bzw. ITS1 bis 3, n=20 pro Medium) inkubierten Explantatzylinder. p = Ergebnisse der student t-Tests.

Im Balkendiagramm in **Bild 7** ist der durchschnittliche Gesamt-GAG-Gehalt (Summe des GAG-Gehaltes der Knorpelimplantate und der GAG-Abgabe in die Nährmedien) dargestellt. Auch hier sind keine gravierenden Unterschiede festzustellen (vgl. p-Werte). Die Knorpelimplantate verlieren also annähernd gleich große Mengen an GAGs in die entsprechenden Nährmedien während ihrer Inkubation.

Vergleichbare DNA- und GAG-Gehalte der Explantate und vergleichbarer GAG-Verlust in die Medien – dies zusammen lässt den Schluss zu, dass jedes der vier Nährmedien für den Einsatz in Kulturexperimenten geeignet ist. Für die Durchführung der

Experimente in „Explantatkultur II“ entschieden wir uns für die ausschließliche Verwendung des Mediums ITS2.

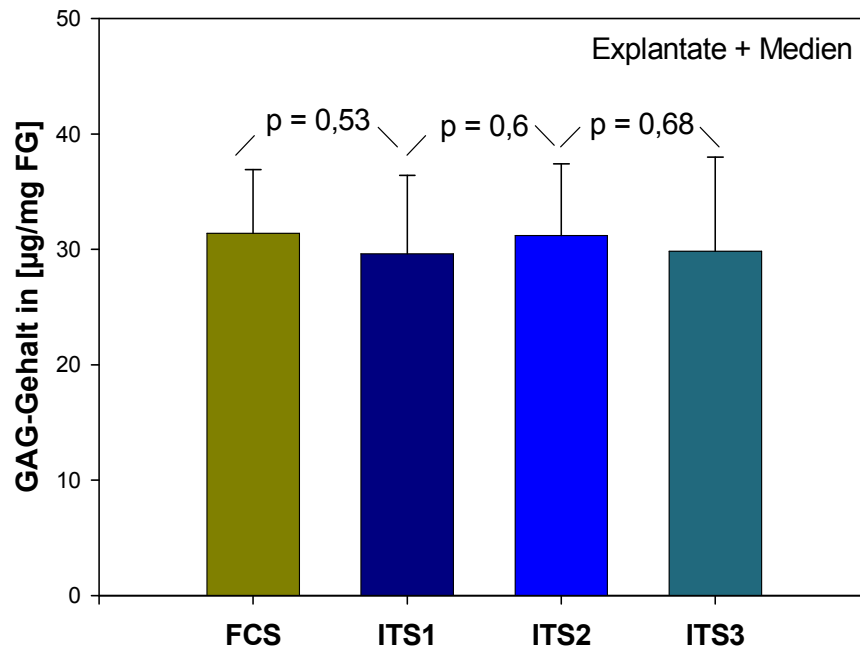


Abb. 7 GAG-Gehalt (Explantat+Medium) abhängig vom Medium

Durchschnittliche Gesamt-GAG-Gehalte (GAG-Gehalte der Explantate + GAG-Verluste in die Medien) [µg/mg FG] (+ Standardabweichungen) der über 21Tage in verschiedenen Nährmedien (FCS bzw. ITS1 bis 4, n=20 pro Medium) inkubierten Explantate. p = Ergebnisse der student t-tests.

Optimierung

Zwischen den Doppelbestimmungen waren zum Teil erhebliche Abweichungen zu verzeichnen (nicht dargestellt). Im Durchschnitt lagen die GAG-Messwerte beider Bestimmungen etwa 30 Prozent auseinander. Diese Diskrepanzen spiegeln die offensichtlich bestehende Heterogenität innerhalb des Knorpelgewebes eines Patienten („intraindividuelle Varianz“) in Bezug auf den GAG-Gehalt wieder. Angesichts dieser Heterogenität ist zu bezweifeln, dass die beiden per Zufall als Nullpunkte ausgewählten Explantate ausreichen, um den Zustand der übrigen, inkubierten Explantatzylinder zum Entnahmezeitpunkt zu repräsentieren. Aufgrund dieses Erkenntnis wurde in Explantatkultur II die Entnahme von Explantaten und Nullpunkten nach der „Ring-Kern-Methode“ (vgl. Kap. 2.1.1) durchgeführt.

Einfluss der in vitro Kultivation auf das Knorpelgewebe

Hinsichtlich des DNA-Gehaltes von Chondrozyten finden sich unterschiedliche Angaben in der Literatur ($11,6 \pm 2,7\text{pg DNA pro Chondrozyt}$ [51] bzw. $7,7\text{pg DNA pro Chondrozyt}$ [53]). Unter der Annahme, dass sich der DNA-Gehalt pro Zelle nicht ändert, kann durch Bestimmung des Knorpel-DNA-Gehaltes pro Gewichtseinheit dennoch auf Veränderungen der Zellzahl geschlossen werden. Somit können mögliche Einflüsse der Kultivationen auf die Chondrozytenzahl abgeschätzt und die Qualität der Kultivationsbedingungen beurteilt werden.

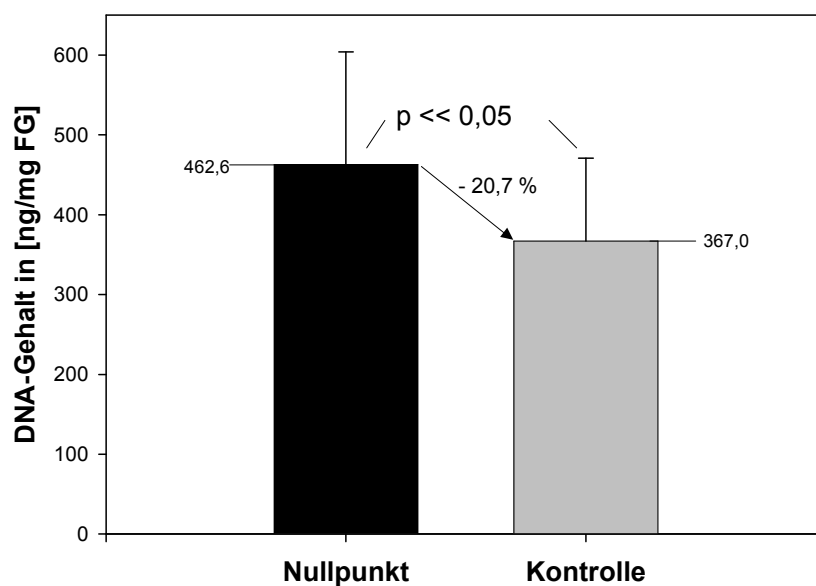


Abb. 8 Vergleich DNA-Gehalt von Nullpunkten und Kontrollen

Durchschnittlicher DNA-Gehalt [ng/mg FG] (+ Standardabweichungen) - aller Nullpunkte (Explantatkultur I+II, n=124) und aller über 21 Tage inkubierten Explantatzylinder (Kontrolle, n=136). p = Ergebnis des student t-tests.

Im Balkendiagramm in **Abbildung 8** ist der durchschnittliche DNA-Gehalt aller Nullkontrollen (aus Explantatkultur I und II, n=124, schwarzer Balken) und der der 21 Tage lang inkubierten Knorpelimplantate (alle vier Medien zusammengefasst, n=136, grauer Balken) dargestellt. Bei den Nullpunkten wurden neben den 25 Patienten aus Explantatkultur I und II auch Messwerte von weiteren Arthrosepatienten – die ansonsten nicht relevant für diese Arbeit sind – einbezogen, um die Datenmenge zu erhöhen. Auch bei den Kontrollen flossen Messwerte dieser Patienten ein. Im Vergleich zu dem der

Nullkontrollen, ist der durchschnittliche DNA-Gehalt aller 21 Tage kultivierten Explantate um 20,7 Prozent geringer (statistisch signifikant, vgl. Abbildung 8).

Dass es sich hierbei allerdings nur um einen scheinbaren DNA- und somit Zellverlust während der Inkubationsphase handelt, wird bei Betrachtung der Abbildungen 9 und 10 deutlich. **Abbildung 9** zeigt das durchschnittliche Feuchtgewicht (mit Standardabweichungen) von Explantatzylindern in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. 21 Tage lang inkubierte Gewebezylinder (n=272) haben im Durchschnitt ein Feuchtgewicht von 13,2mg. Solche, die sich nur 14 Tage in Kultur befanden (n=90) weisen mit durchschnittlich 11,9mg ein um 10,9 Prozent geringeres Feuchtgewicht auf (vgl. Bild 8, p=0,002).

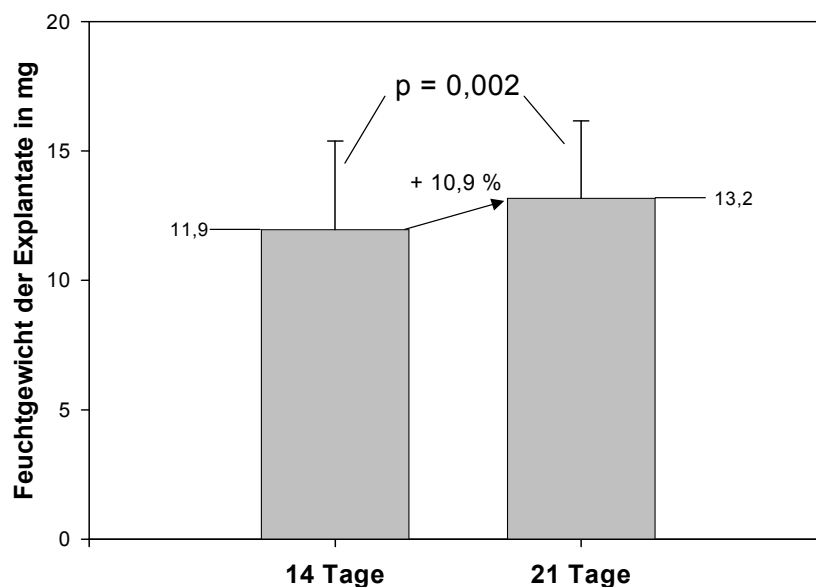


Abb. 9 Vergleich Feuchtgewichte von 14- bzw. 21-Tagesstanzen

Durchschnittliches Feuchtgewicht in mg (+ Standardabweichungen) aller 14 Tage (n=90) und 21 Tage (n=272) inkubierten Explantatzylinder. p = Ergebnis des student t-tests.

In **Abbildung 10** sind die durchschnittlichen DNA-Gehalte (mit Standardabweichungen) in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivation dargestellt. Der Durchschnitts-DNA-Gehalt der „14 Tage-Explantate“ (n=60, 406,7ng/mg FG) liegt 9,8 Prozent über dem der „21 Tage-Explantate“ (n=136, 367,0ng/mg FG).

Unter Berücksichtigung des Feuchtgewichtszuwachses zwischen der zweiten und dritten Inkubationswoche weisen die Explantate somit annähernd identische DNA-Gehalte auf. Demnach ist kein echter DNA- und damit Zellverlust zu verzeichnen und die scheinbare Abnahme des DNA-Gehaltes am ehesten auf das Quellverhalten der kultivierten Explantate zurückzuführen.

Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die *in vitro* Kulturbedingungen von Explantatkultur I und II geeignet sind, die Vitalität der Knorpelzellen und somit den funktionellen Status des Gewebes aufrecht zu erhalten.

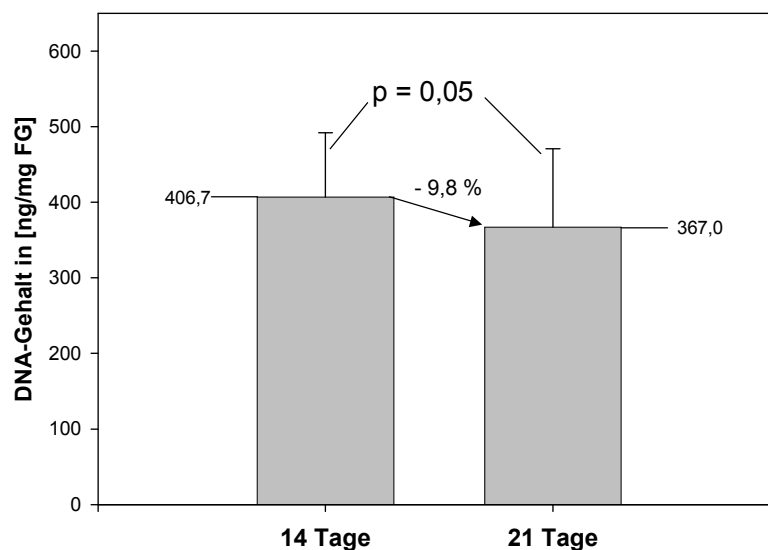


Abb. 10 Vergleich DNA-Gehalte von 14- bzw. 21-Tagesstanzen

Durchschnittlicher DNA-Gehalt [ng/mg FG] (+ Standardabweichungen) aller 14 Tage (n=60) und 21 Tage (n=136) inkubierten Explantatzylinder. p = Ergebnis des student t-tests.

3.2 Explantatkultur II – basaler Stoffwechsel und IL-1 β (Ziel 2)

Knorpelgewebe von 15 Patienten wurde für diese Explantatkulturen verwendet. Jedem dieser Patienten wurden vier Explantatzylinder entnommen, wovon zwei der Kontrollgruppe (Inkubation in ITS2-Medium) und zwei der Versuchsgruppe (Inkubation in ITS2-Medium plus 10ng/ml IL-1 β) zugeordnet wurden. Für jeden Explantatzylinder wurde ein Teil des die Entnahmestelle umgebenden Ringes als Nullpunkt entnommen („Ring-Kern Methode“). Die Inkubationsdauer betrug 14 Tage.

DNA – Gehalt

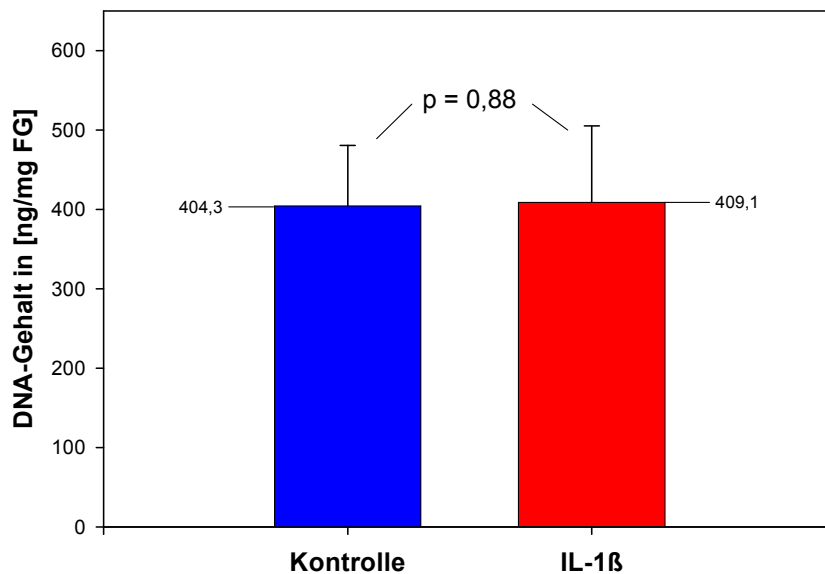


Abb. 11 Vergleich DNA-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen

Durchschnittlicher DNA-Gehalt [ng/mg FG] (+ Standardabweichungen)
 - der im Medium ITS4 (Kontrolle, n=30) und der unter Zugabe von IL-1 β (IL-1 β , n=30) über 14 Tage inkubierten Explantatzylinder. p = Ergebnis des student t-tests.

Das Diagramm in **Abbildung 11** zeigt den durchschnittlichen DNA-Gehalt aller Explantatzylinder der Kontrollgruppen (blauer Balken, n=30) sowie der Versuchsgruppen (roter Balken, n=30) der 15 Patienten. Es besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich des DNA-Gehaltes zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (p=0,88). Die annähernd gleichgroßen DNA-Werte der inkubierten Gewebezyylinder (Kontroll- und Versuchsgruppen, vgl. Abbildung 10) ermöglichen die Betrachtung der Messwerte als zusammenhängende Datenmenge. So wurde der durchschnittliche DNA-Gehalt aller 14 Tage inkubierten Explantatzylinder in die Darstellung in Abbildung 10 einbezogen.

Glykosaminoglykangehalt

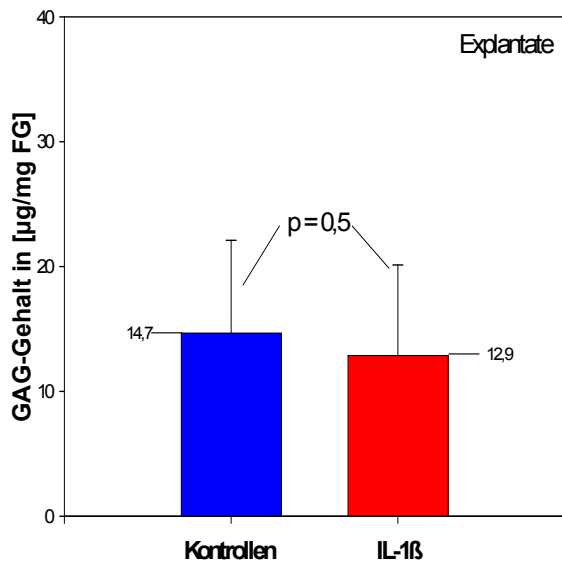


Abb. 12a

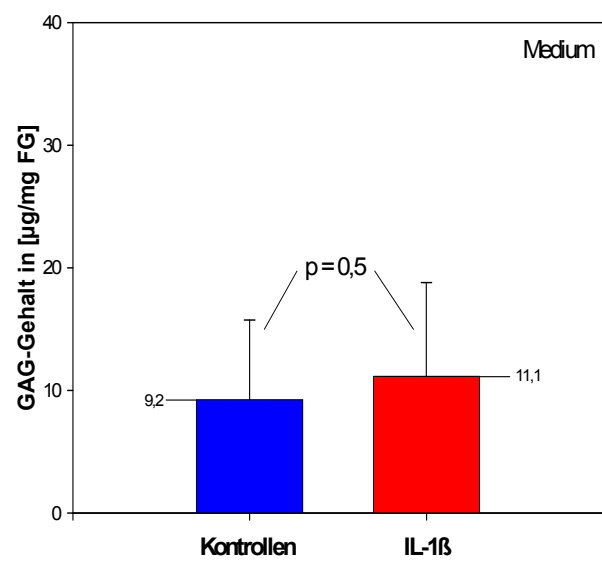


Abb. 12b

Abb. 12 GAG-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen

Durchschnittsgehalt an GAGs [µg/mg FG] der Explantate (+ Standardabweichungen) - aller Kontrollen (n=30) und mit IL-1β (n=30) behandelten Explantate der 15 Patienten. p = Ergebnis des student t - tests.

Durchschnittlicher GAG-Verlust ins Medium [µg/mg FG] (+ Standardabweichung) aller Explantate aus Kontroll- (n=30) und Versuchsgruppen (n=30) der 15 Patienten. p = Ergebnis des student t - tests.

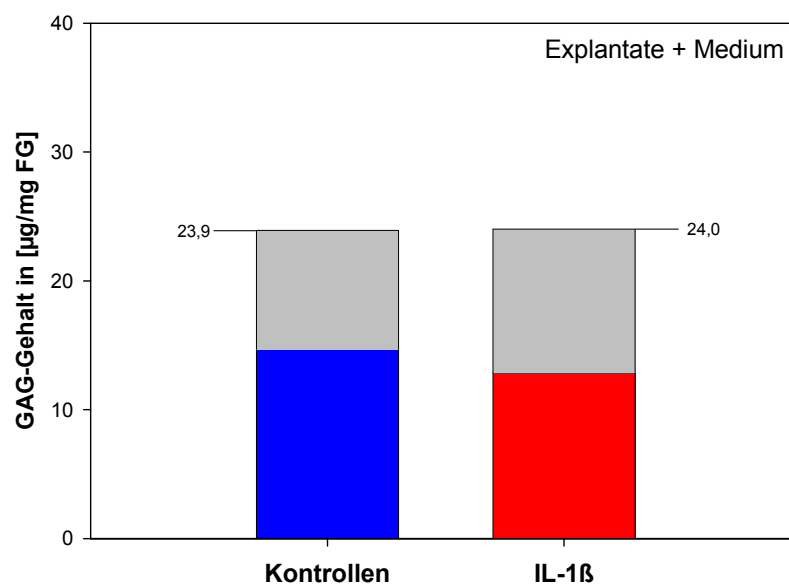


Abb. 13 Gesamt-GAG-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen

Durchschnittsgehalt an GAGs der Explantate (vgl. Bild 12) plus durchschnittlicher GAG-Verlust in die Nährmedien [µg/mg FG] (grauer Anteil der farbigen Balken).

In **Abbildung 12a** ist der durchschnittliche GAG-Gehalt (mit Standardabweichung) der Kontrollen (blauer Balken) und der mit IL-1 β behandelten Knorpelstanzzyylinder (roter Balken) der 15 Patienten dargestellt. Zwischen den Explantaten der Kontroll- und der Versuchsgruppen zeigt sich bezüglich des GAG-Gehaltes nur ein minimaler Unterschied ($p=0,5$, nicht signifikant). Die während der Kultivationen aus den Explantaten in die Nährmedien „ausgewaschenen“ GAGs wurden ebenfalls bestimmt und auf die Feuchtgewichte der entsprechenden Zylinder bezogen. **Abbildung 12b** zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Medien der Kontroll- und Versuchsgruppen. Auch hier zeigt sich mit $p=0,5$ keine relevante Differenz zwischen beiden Gruppen. Die auffällig großen Standardabweichungen sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchsgruppen (vgl. Abbildungen 12a und b) zeugen von Streuungen der GAG-Gehalte zwischen den 15 Patienten (interindividuelle Varianz). Die GAG-Streuungen unter den verschiedenen Versuchsgruppen könnten auch Ausdruck eines inhomogenen Reaktionsverhaltens der Knorpelimplantate der einzelnen Patienten sein. Um diesbezüglich Klarheit zu erhalten, wurden die GAG-Gehalte von Kontroll- und Versuchsgruppen der 15 Patienten später auch individuell dargestellt.

Hinsichtlich des Gesamt-GAG-Gehaltes (GAG-Gehalt der Explantate + Verlust ins Medium) weisen die mit und ohne IL-1 β inkubierten Explantatzylinder nahezu identische Werte auf. Dies wird bei Betrachtung von **Abbildung 13** deutlich, das den GAG-Gehalt der Explantate (farbige Balken) und den der Medien (graue Balken) als Summe darstellt.

Matrix – Metallo – Proteinase in Mediumüberständen

Die MMPs (d.h. MMP-2, -9 und Pro-MMP-2) der Medien der Kontroll- und Versuchsgruppen der 15 Patienten wurden nach Beendigung der Kultivationen mittels Gelatinezymographie bestimmt. Zuvor wurden die Medienüberstände bei den Mediumwechseln gesammelt, gepoolt und anschließend stets bei 4° Celsius gelagert.

Zwar sind Zymogramme nicht geeignet, quantitative Bestimmung der jeweiligen MMPs vorzunehmen, allerdings können anhand der Banden bzw. Bandenstärken grobe Aussagen über relative Mengenverhältnisse bezüglich der Proteasen getroffen werden. Auf den **Abbildungen 14a bis e** sind Zymogramme der Medien (Kontrollgruppen links, Versuchsgruppen rechts) von fünf verschiedenen Patienten zu sehen. Die Identität der dargestellten Banden wurde mittels eines Markers (Roti®-Mark Standard, nicht dargestellt) ermittelt und die Banden sind jeweils entsprechend beschriftet.

Die Zymogramme der einzelnen Patienten weisen große Unterschiede, insbesondere bezüglich der MMP-2 und ihrer Pro-Form auf. Während bei einigen Patienten

mengenmäßig die Pro-MMP-2 der MMP-2 überwiegt (vgl. Abbildungen 14b, d und e), verhält es sich bei anderen genau umgekehrt (vgl. Abbildungen 14a und c). Vor allem sind jedoch Unterschiede hinsichtlich der MMPs in den Medien aus Kontroll- bzw. Versuchsgruppe festzustellen. Zum Teil führt die Behandlung mit IL-1 β zu verstärktem Vorkommen bestimmter MMPs im Medium (vgl. Abbildung 14c), zum Teil sind in der IL-1 β Gruppe aber auch schwächere Banden (vgl. Abbildung 14d) bzw. überhaupt keine (vgl. Abbildung 14a) zu beobachten. Die Abbildungen 14b und e sind hingegen Beispiele für ein scheinbar identisches Pro-MMP-2 bzw. MMP-2-Vorkommen in Medien der Versuchs- und Kontrollgruppen. Interessanterweise sind nur in den Zymogrammen der **Abbildungen 14d** und **14e** Banden im Medium der Versuchsgruppen nachweisbar, die der Pro-MMP-9 entsprechen.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass beinahe jeder Patient sein eigenes MMP-Profil aufweist, bzw. dass es zumindest eine große Heterogenität hinsichtlich des Erscheinens von MMPs in den Medien unter den verschiedenen Patienten bzw. Explantaten gibt.

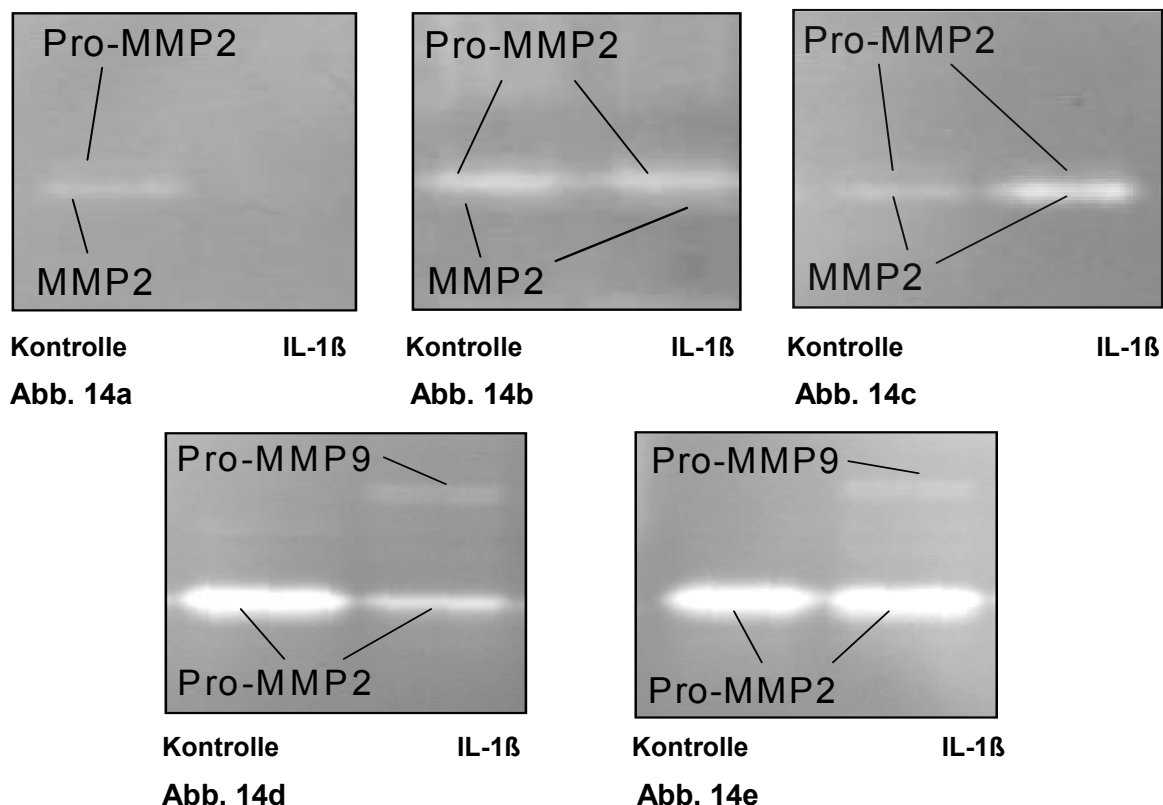


Abb. 14 Gelatinezymographien ausgewählter Patienten

Gelatinezymographien der Medien fünf verschiedener Patienten (Kontrollgruppen links, Versuchsgruppen rechts). Identität der MMPs (Pro-MMP2, MMP2 und Pro-MMP9) wurden mittels eines Proteinmarkers ermittelt (nicht dargestellt).

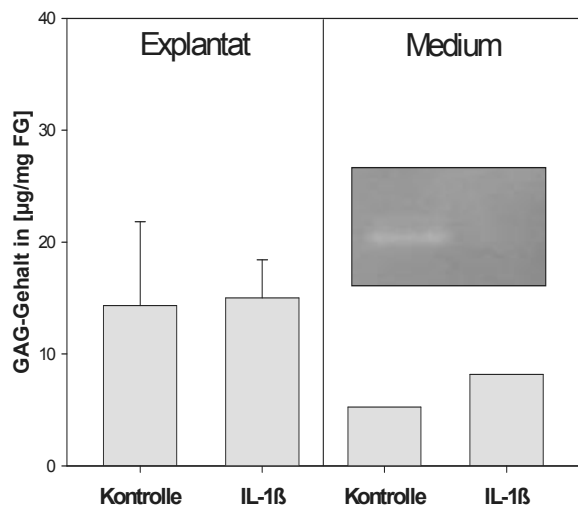


Abb. 15a

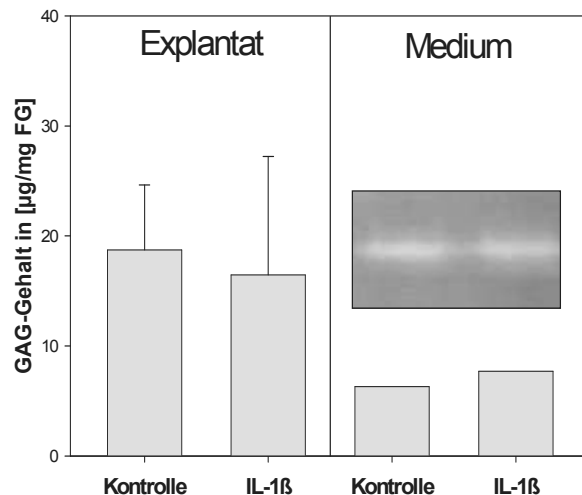


Abb. 15b

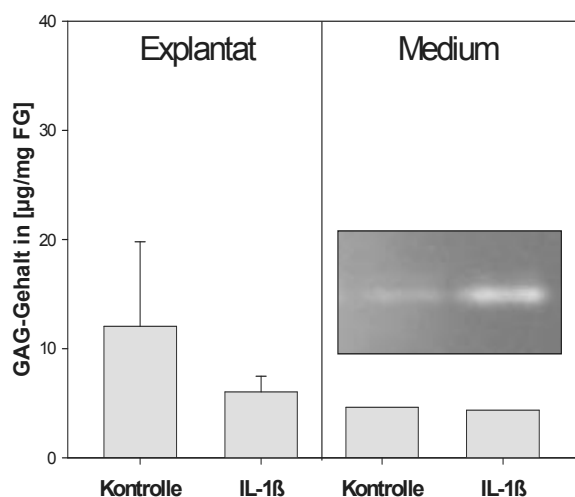


Abb. 15c

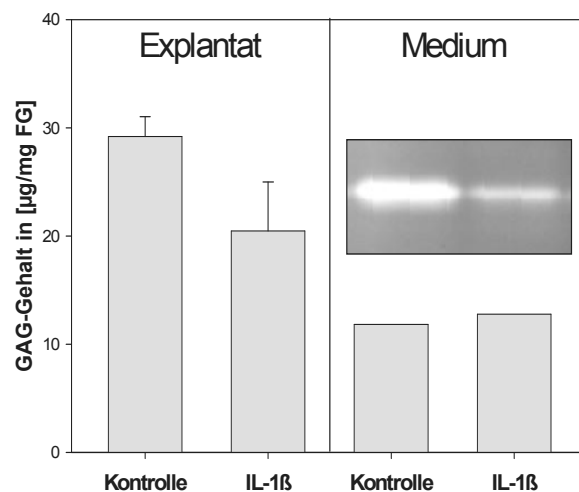


Abb. 15d

Abb. 15 GAG-Gehalte ausgewählter Patienten

Durchschnittlicher GAG-Gehalt der Explantate (links) und GAG-Verluste in die Medien (rechts) [µg/mg FG] jeweils für Kontroll- und Versuchsgruppen (n=2) der fünf Patienten aus den Bildern 13a bis e. Die entsprechenden Ausschnitte der Zymogramme sind eingefügt.

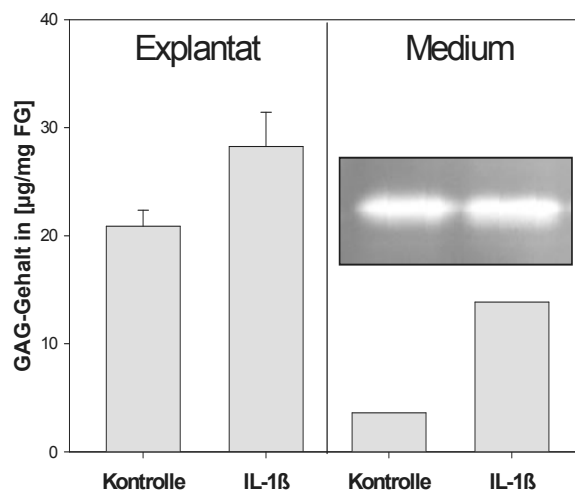


Abb. 15e

Die **Abbildungen 15a bis e** zeigen durchschnittliche GAG-Gehalte der Kontroll- und Versuchsgruppen der Explantate und Medien der fünf Patienten, deren Zymogramme in den Abbildungen 14a bis e zu sehen sind. Relevante Ausschnitte der entsprechenden Zymogramme sind jeweils eingeblendet.

Bezüglich des Erscheinens von GAGs in den Nährmedien nach IL-1 β Exposition und dem Nachweis von MMPs lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang feststellen. Dies ist bemerkenswert, zumal sowohl der GAG-Verlust aus dem Gewebe als auch die Expression von MMPs als Ausdruck einer katabolen Stimulation (IL-1 β) von Knorpelgewebe angesehen wird [131].

3.2.1 Einzeldarstellung der Glykosaminoglykangehalte

Um Veränderungen des GAG-Gehaltes der Explantate einzelner Patienten unter dem Einfluss von IL-1 β beurteilen zu können, wurden hier die GAG-Messwerte der Gewebezylinder (Kontroll- und Versuchsgruppe) für jeden der 15 Patienten dargestellt. Zur Erhöhung der Validität wurden dafür zwei Bestimmungsmethoden (Methode a und b) angewendet.

Methode a)

Der durchschnittliche GAG-Gehalt der Gewebezylinder der Kontrollgruppe (Kontrolle, n=2) und der Versuchsgruppe (IL-1 β , n=2) jedes der 15 Patienten wurde durch eine Gerade verbunden (**Abbildung 16**).

Die Knorpel-explantate der 15 Patienten zeigen verschiedene Reaktionen im Hinblick auf den GAG-Gehalt des Gewebes von Kontroll- bzw. Versuchsgruppe. Diese sind im Diagramm in Abbildung 16 farblich gekennzeichnet. Rote Graphen markieren Patienten, deren Gewebe während der Inkubationsphase GAGs verlieren („katabol“). Diejenigen, deren Explantate an GAGs zunehmen („anabol“) sind durch blaue Geraden markiert, während die schwarzen Graphen Patienten mit unverändertem („konstant“) GAG-Gehalt im Explantatgewebe kenntlich machen. Um als „katabol“ bzw. „anabol“ eingestuft zu werden, musste das jeweilige Knorpelgewebe der Versuchsgruppe bezüglich des GAG-Gehaltes der Kontrollgruppe mindestens 10% verlieren bzw. hinzugewinnen (Hintergrund: Minimierung des Einflusses systematischer Fehler). Patienten, deren Versuchsgruppe weniger als 10% im Bezug auf den GAG-Gehalt der Kontrollgruppe zulegte oder verlor, wurden folglich als „konstant“ eingestuft.

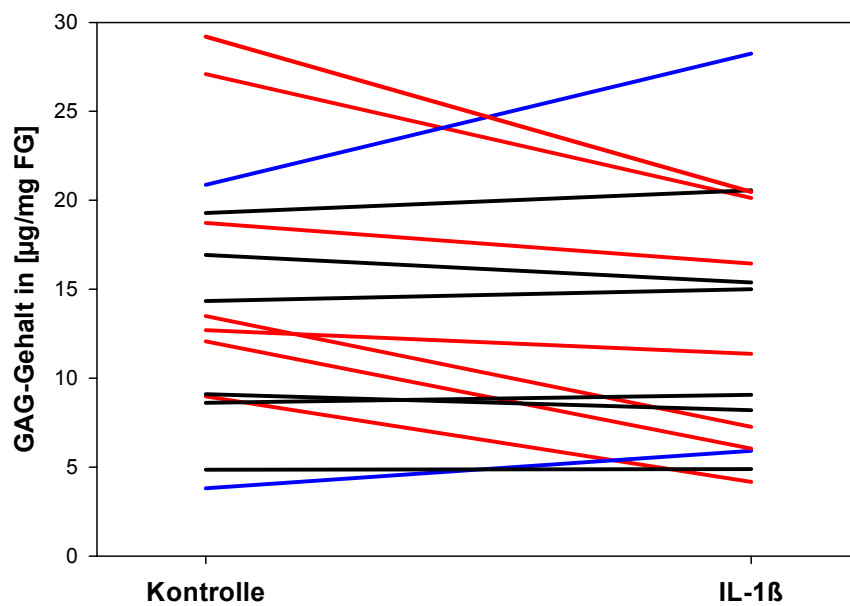


Abb. 16 GAG-Gehalte aller Patienten (Einzeldarstellung, Methode a)

Durchschnittlicher GAG-Gehalt $[\mu\text{g/mg FG}]$ der Explantatzylinder jedes Patienten ($n=15$) der Kontrollgruppen (Kontrolle) und der Versuchsgruppen (IL-1 β). rote Graphen: Abnahme des GAG-Gehaltes $> 10\%$, blaue Graphen: Zunahme des GAG-Gehaltes $> 10\%$, schwarze Graphen: Ab- oder Zunahme $< 10\%$ („konstant“)

Scheinbar zeigt Knorpelgewebe unterschiedliche Reaktionen auf den IL-1 β Stimulus. Demnach würde das Zytokin neben seiner bekannten katabolen Wirkung auf Knorpelgewebe, in einigen Fällen auch keine Wirkung bzw. sogar einen anabolen Effekt entfalten.

Allerdings hätte aufgrund der Varianz der GAG-Gehalte innerhalb des Knorpels eines Gelenkes, die GAG-Differenz zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe schon vor Beginn der Inkubation beträchtlich sein können – und muss nicht zwangsläufig aus der Behandlung mit IL-1 β resultieren. Um dies zu überprüfen, wurde zusätzlich Methode b angewendet.

Methode b)

Hier wurden durch Einbeziehung der GAG-Werte der den Explantatzylindern zugehörigen Nullpunkte (theoretische) GAG-Werte der Versuchsgruppen (IL-1 β) berechnet (vgl. Kap. 2.3). Bei den GAG-Gehalten der Kontrollgruppen (Kontrolle) handelt

es sich (wie bei Methode a) um die absoluten Messwerte. Katabole Reaktionen sind erneut durch rote und anabole Reaktionen durch blaue Graphen dargestellt. Schwarze Graphen zeigen wiederum Patienten, deren mit IL-1 β behandeltes Knorpelgewebe mit Glykosaminoglykanzu- oder abnahmen kleiner als 10% des GAG-Gehaltes der Kontrollgruppe reagierte („konstant“). Die drei Reaktionsmuster des Knorpelgewebes auf die IL-1 β Exposition (vgl. Abbildung 16) lassen sich auch bei der Einzeldarstellung nach Methode b erkennen (**Abbildung 17**).

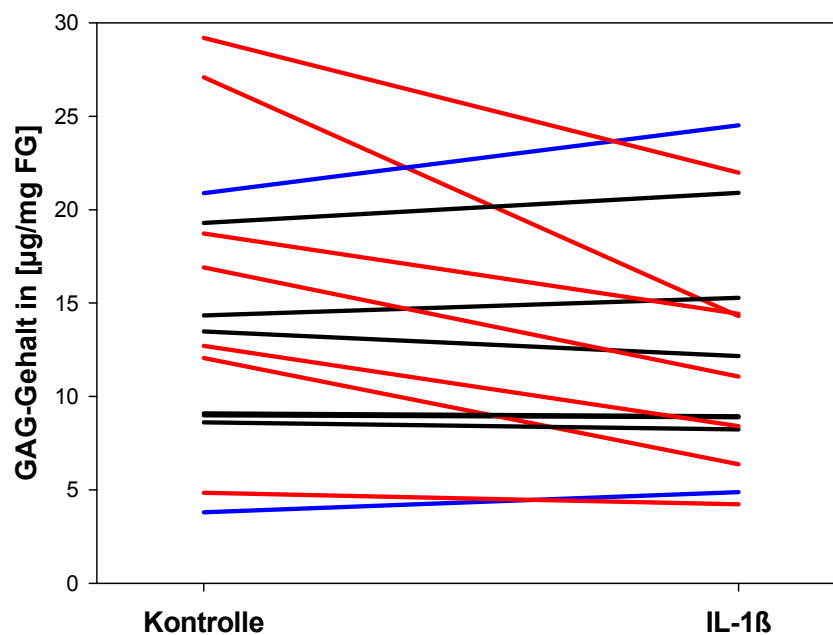


Abb. 17 GAG-Gehalte aller Patienten (Einzeldarstellung, Methode b)

GAG-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ FG] der Explantatzylinder jedes Patienten ($n=15$). Kontrollgruppen (Kontrolle), Versuchsgruppen (IL-1 β). Die GAG-Gehalte der Versuchsgruppen beziehen die Nullkontrollen ein (Methode b). rote Graphen: Abnahme des GAG-Gehaltes $> 10\%$, blaue Graphen: Zunahme des GAG-Gehaltes $> 10\%$, schwarze Graphen: Ab- oder Zunahme $< 10\%$ („konstant“)

Methode a und b zeigen im Ergebnis eine gemeinsame Schnittmenge von 12 Patienten (vgl. Abbildungen 16 und 17). Das bedeutet, dass das Reaktionsmuster des Knorpelgewebes von 12 der 15 Patienten unabhängig von der Bestimmungsmethode gleich klassifiziert wurde. Im Einzelnen heißt das, dass im Ergebnis beider Bestimmungsmethoden das Gewebe von sieben Probanden „katabol“, das von zweien „anabol“ und jenes von drei Patienten „konstant“ auf die Inkubation reagierte. Der GAG-Gehalt des Knorpelgewebes von zwei

Patienten nahm zwar ab, jedoch einmal um mehr als 10% (Methode a) und einmal um weniger als 10% (Methode b), weshalb diese Explantate einmal als „katabol“ und einmal als „konstant“ betrachtet werden mussten. Lediglich das Gewebe eines Patienten zeigte einmal eine GAG-Abnahme (Methode a) und einmal eine leichte GAG-Zunahme (Methode b, vgl. Abbildungen 16 und 17).

Das Ergebnis der Korrelationsanalyse der Werte aus Methode a und b ($\rho=0,85$, $p<<0,05$, graphisch dargestellt in **Abbildung 18**) deutet auf eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden hin und untermauert die Vermutung, dass IL-1 β unterschiedliche Reaktionen bei humanem osteoarthrotischen Knorpelgewebe hervorrufen kann.

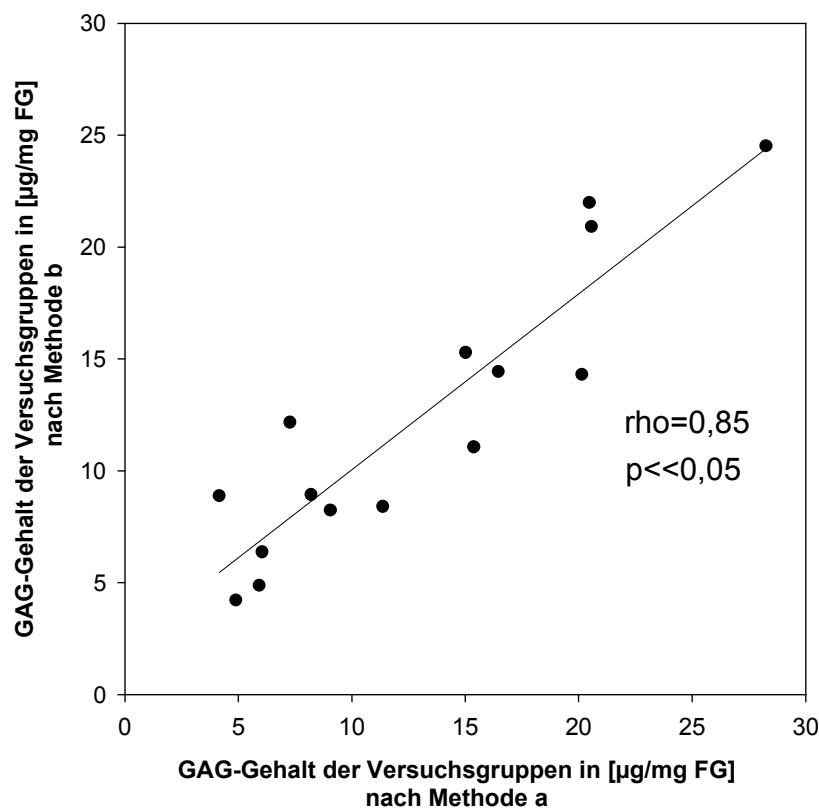


Abb. 18 Korrelationsanalyse der Methoden a und b

Korrelation (Spearman's rank) der mittels Methode a (Abzisse) bzw. Methode b (Ordinate) bestimmten GAG-Gehalte der Versuchsgruppen (n=15).

Von den 12 Patienten, deren Knorpelimplantate nach beiden Methoden identisch klassifiziert wurden, zeigten zwei besonders deutliche Reaktionen auf die Behandlung mit

IL-1 β während der Kultivation. Zum einen handelt es sich um einen Patienten, dessen Knorpelimplantate aus der Versuchsgruppe je nach Bestimmungsmethode gegenüber denen der Kontrollgruppe 24,7 bzw. 29,9% des GAG-Gehaltes verloren (katabole Reaktion des Gewebes auf IL-1 β). Demgegenüber legte das mit IL-1 β behandelte Gewebe des anderen Patienten um 17,5 bzw. 35,3% gegenüber dem der Kontrollgruppe zu (anabole Reaktion des Gewebes).

Diese beiden Patienten werden nachfolgend entsprechend des katabolen bzw. anabolen Reaktionsmusters als „Patient K“ bzw. „Patient A“ bezeichnet. Die Diagramme in den **Abbildungen 19a** und **19b** stellen die Reaktionsmuster dieser beiden Patienten zur Veranschaulichung gesondert dar.

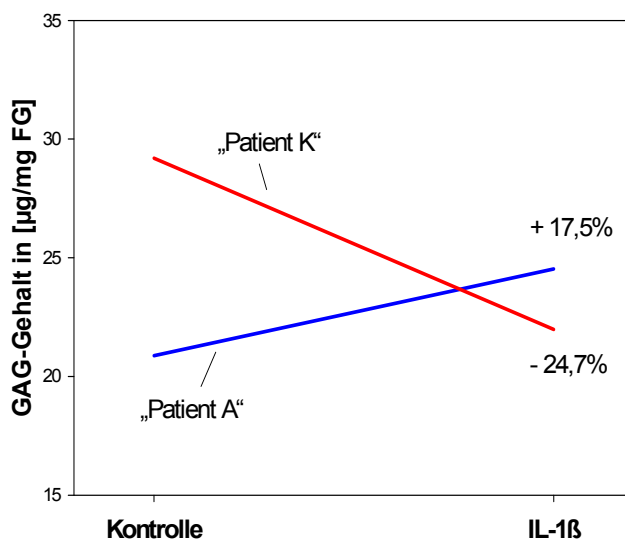


Abb. 19a

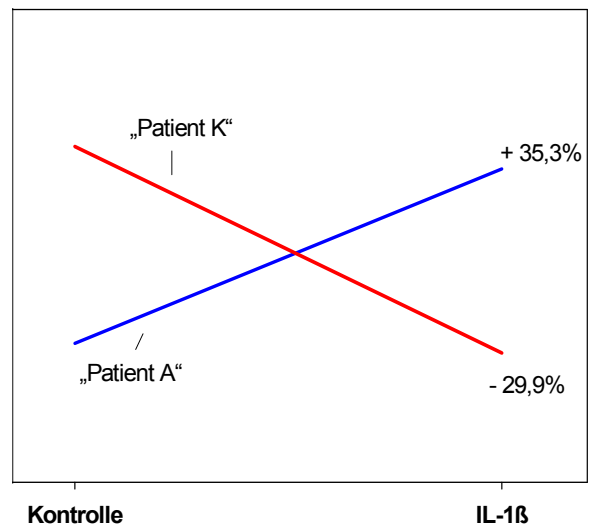


Abb. 19b

Abb. 19 GAG-Gehalte der Patienten „A“ und „K“ (nach Methode a und b)

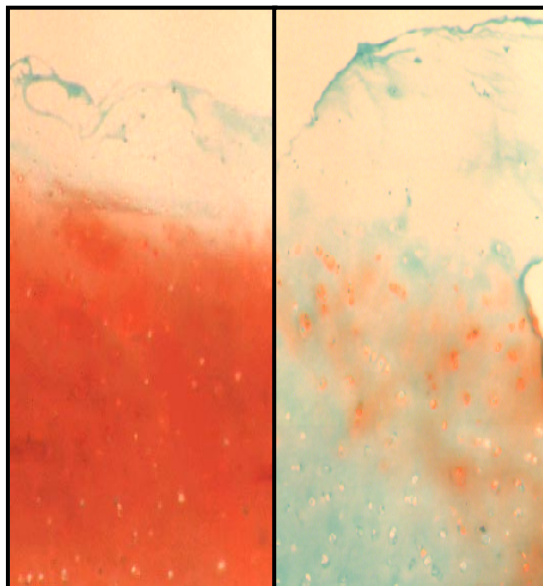
Durchschnittlicher GAG-Gehalt [$\mu\text{g/mg FG}$] der Explantatzylinder der Patienten „K“ und „A“. Kontrollgruppen (Kontrolle), Versuchsgruppen (IL-1 β).

Durchschnittlicher GAG-Gehalt [$\mu\text{g/mg FG}$] der Explantatzylinder der Patienten „K“ und „A“. Kontrollgruppen (Kontrolle), Versuchsgruppen (IL-1 β). Die GAG-Gehalte der Versuchsgruppen wurden unter Einbeziehung der Nullpunkte berechnet (Methode b).

3.3 Mikroheterogenität

Anhand von Gefrierschnitten der Stanzzyylinder aus Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient A“ und „Patient K“ wurden histologische Färbungen sowohl in konventioneller Safranin O - Technik als auch mit fluoreszierenden Antikörpern angefertigt, um zu erwartende Unterschiede bezüglich des Glykosaminoglykanstoffwechsels und auch des Kollagenstoffwechsels sichtbar zu machen.

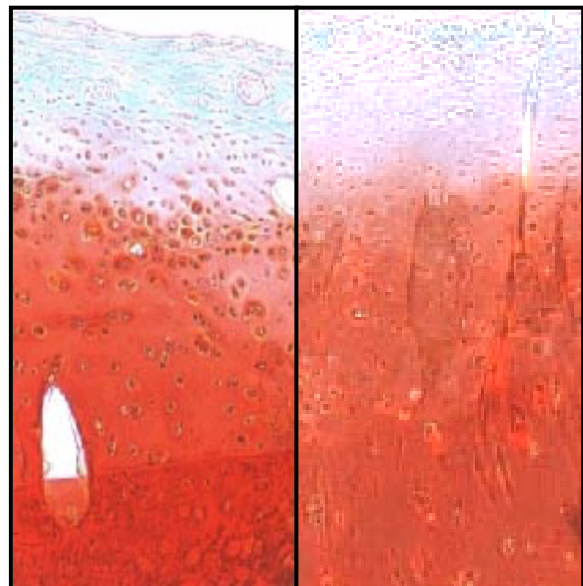
3.3.1 Safranin O - Färbung



Kontrolle

IL-1 β

Abb. 20a



Kontrolle

IL-1 β

Abb. 20b

Abb. 20 Safranin O - Färbungen der Patienten „K“ und „A“

Safranin O-Färbung von Schnitten der Knorpelimplantatzylinder von „Patient K“ (19a Originalvergrößerung 10-fach) aus Kontroll- und Versuchsgruppe. GAG-reiche Regionen erscheinen rot. Regionen, in denen Kollagen überwiegt, erscheinen grünlich. Deutlicher GAG-Verlust nach IL-1 β Behandlung (kataboler GAG-Stoffwechsel).

Safranin O-Färbung von Schnitten der Knorpelimplantatzylinder von „Patient A“ (19b Originalvergrößerung 10-fach) aus Kontroll- und Versuchsgruppe. GAG-reiche Regionen erscheinen rot. Regionen, in denen Kollagen überwiegt, erscheinen grünlich. Kein GAG-Verlust nach Behandlung mit IL-1 β (kein kataboler GAG-Stoffwechsel).

Die Präparate auf **Abbildung 20a** zeigen Safranin O - Färbungen des Knorpelgewebes von „Patient K“. Auf der linken Seite ist der Schnitt eines Stanzzyinders der Kontrollgruppe zu sehen, der auf der rechten Seite stammt aus der mit IL-1 β behandelten Versuchsgruppe. Der

deutliche Unterschied in der Rotfärbung weist auf einen erheblichen Verlust an GAGs durch die Behandlung mit IL-1 β hin.

Im Gegensatz dazu weisen die Schnitte des Gewebes aus der Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient A“ (**Abbildung 20b**) keinen Unterschied bezüglich des Gehaltes an GAGs auf. Die Kultivierung des Explantatzylinders mit IL-1 β hat hier offenbar nicht zu einem erheblichen GAG-Verlust geführt. Obwohl auf Grundlage von Safranin O-Färbungen keine Aussagen über die Menge im Präparat enthaltener GAGs getroffen werden können (Rotfärbung erst ab GAG-Gehalt von etwa 60 Prozent), wird dennoch deutlich, dass IL-1 β unterschiedliche Einflüsse auf die GAG-Konzentrationen in Knorpelgewebe besitzt. Im Fall des „Patienten K“ wird dessen im DMB-Assay nachgewiesene katabole Reaktion auf IL-1 β (vgl. Abbildungen 19a und 19b) anhand der Safranin O - Färbung untermauert – und bei „Patient A“ dessen anabole Reaktion zumindest nicht widerlegt.

3.3.2 Immunhistologie

Aggrekansynthese und Aggrekanspaltung (AB-846 und 1031)

Wie bereits erwähnt (vgl. Kap. 2.4.3.1), gelingt durch diese Technik eine simultane Darstellung der Epitope 846 und 1031, die Korrelate für Aggrekansynthese und Abbau sind. Entsprechend der Fluoreszenz der Zweitantikörper erscheinen Regionen mit Aggrekansynthese grün und Regionen mit Aggrekanspaltung rot im Präparat.

Die Schnitte in **Abbildung 21** zeigen immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte vom Knorpelgewebe des „Patienten K“. Auf dem Gewebeschnitt eines Explantates aus der Kontrollgruppe zeigt sich eine deutliche Grünfärbung der Chondrozyten, vor allem im Bereich der mittleren Zone des Knorpels. Es sind sogar deutliche Höfe von grüner Fluoreszenz um die Chondrozyten herum (perichondrozytär) zu sehen. Diese Höfe entsprechen deponiertem neu synthetisiertem Aggrekan und zeugen von ausgeprägter Syntheseleistung der Knorpelzellen. Nur in der oberflächlichen und in der tiefen Zone der Knorpelschicht sind auch rote Fluoreszenzen als Zeichen der Aggrekanspaltung erkennbar.

Nach Inkubation mit IL-1 β hat sich das immunhistologische Erscheinungsbild des Gewebes völlig gewandelt. Über alle Knorpelzonen hinweg dominiert nun eine kräftige Rotfärbung der Chondrozyten als Ausdruck des Aggrekanabbaus und damit eines katabolen Aggrekanstoffwechsels. Perichondrozytär findet sich zum Teil wiederum abgelagertes Material, das die Ausgeprägtheit dieses Katabolismus unterstreicht.

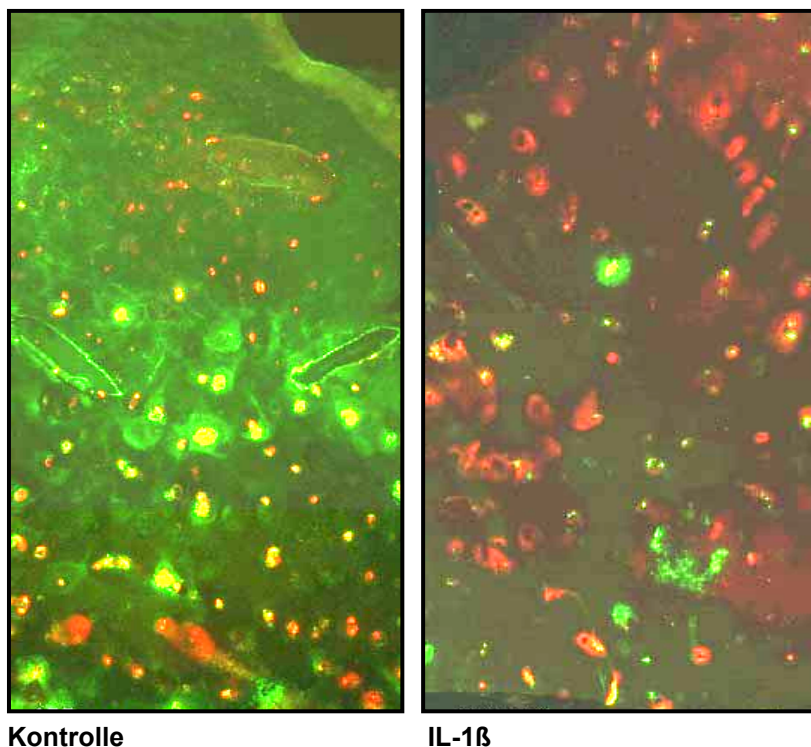


Abb. 21 Aggrekansynthese und Abbau („Patient K“)

Aggrekansynthese (grün) und Aggrekanspaltprodukt (rot) in Gefrierschnitten der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient K“ (Originalvergrößerung 10-fach).

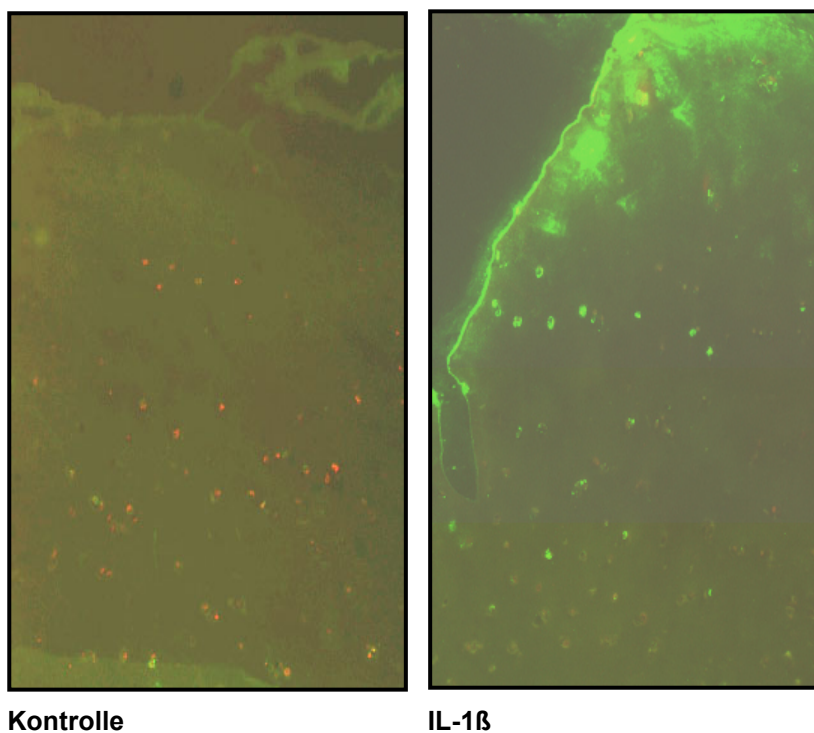


Abb. 22 Aggrekansynthese und Abbau („Patient A“)

Aggrekansynthese (grün) und Aggrekanspaltprodukt (rot) in Gefrierschnitten der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient A“ (Originalvergrößerung 10-fach).

Auf **Abbildung 22** sind Präparate der Knorpelimplantate von „Patient A“ zu sehen. Die im Vergleich zu „Patient K“ deutlich schwächer ausgeprägten Fluoreszenzsignale sprechen für einen moderateren Synthese- bzw. Abbau von Aggrekan. Zudem erkennt man im Gewebe der Kontrollgruppe eine relativ homogen über die Schichten verteilte Rotfärbung der Chondrozyten, was einem Überwiegen kataboler Vorgänge entspricht. Nur sehr vereinzelt sind grüne Signale, vor allem in der tiefen Knorpelschicht, auszumachen. Bei dem mit IL-1 β behandelten Knorpelimplantat finden sich kaum noch rote Fluoreszenzsignale. Insbesondere in der mittleren Gewebeschicht sind außerdem vereinzelt grüne Signale zu erkennen. Hier ist es scheinbar zu einer Verminderung des Katabolismus gekommen. Aufgrund der vereinzelt Grünfärbungen, kann sogar auf die Überführung des Gewebes in eine diskret anabole Stoffwechsellage durch IL-1 β geschlossen werden. Die ausgeprägte Grünfärbung im Schnitt der Versuchsgruppe (Abbildung 22) im Bereich der superfiziellen Zone wurde nicht zur Beurteilung des Präparates herangezogen, da es sich hierbei nicht um Korrelate einer Aggrekansynthese sondern um Präparationsartefakte handelt, die wahrscheinlich auf ungenügendes Auswaschen des mit dem grünen Farbstoff gekoppelten Zweitantikörpers zurückzuführen sind.

Die Darstellungen der Aggrekansynthese und des Aggrekanabbaus decken sich sowohl bei „Patient K“ als auch bei „Patient A“ mit den Ergebnissen der GAG-Bestimmung im DMB-Assay (vgl. Bild 19a und 19b). Auch die Resultate der jeweiligen Safranin O - Färbungen untermauern dies („Patient K“), bzw. stehen dem nicht entgegen („Patient A“).

Besonders bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass das Gewebe nicht homogen auf den IL-1 β - Stimulus reagiert. Dies wird vor allem im Schnitt der Versuchsgruppe von „Patient K“ auf deutlich (vgl. Abbildung 21). Inmitten der „katabol eingestellten“ Zellen befinden sich einzelne Chondrozyten, die entgegen ihrer Nachbarzellen („entgegen dem Strom“) Aggrekan synthetisieren. Vereinzelt finden sich sogar Knorpelzellen, die unlängst mit der Synthese von Aggrekan begonnen haben (grüner Zellkörper), während sie noch von Aggrekanspaltprodukt umgeben werden (roter Hof). Solche Zellen scheinen individuell anabol auf die Anwesenheit von IL-1 β zu reagieren. Zumindest wird deutlich, dass das Knorpelgewebe nicht homogen auf die Anwesenheit von IL-1 β reagiert, sondern auf zellulärer Ebene eine Heterogenität (Mikroheterogenität) aufweist. Auch anhand des Schnittes der Kontrollgruppe (OA-Knorpel) lässt sich diese Heterogenität nachvollziehen.

Kollagensynthese und Kollagenspaltung (AB-CPII und C2C)

Hier erfolgte die Darstellung der Epitope CPII und C2C, welche neu gebildetem Prokollagen bzw. gespaltem Kollagen Typ II entsprechen. Prokollagen erscheint im Präparat grün, Kollagenspaltprodukte rot.

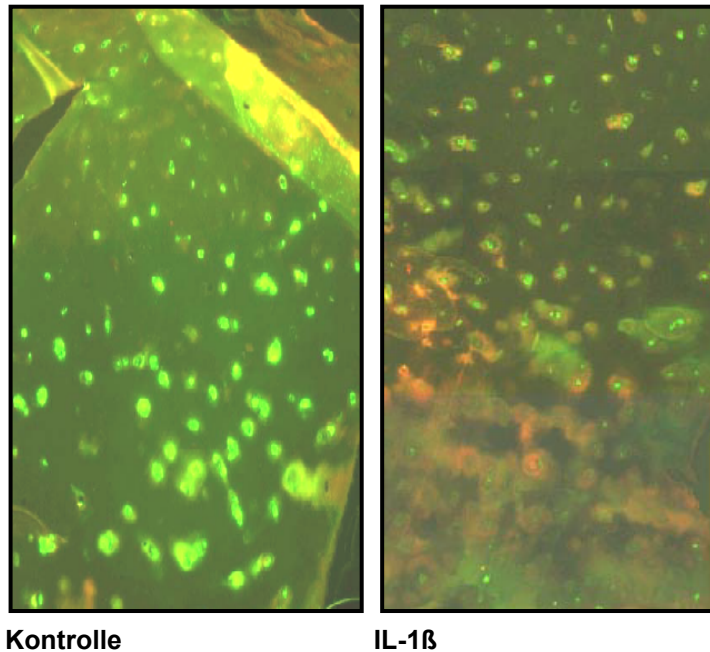


Abb. 23 *Kollagensynthese und Abbau („Patient K“)*

Kollagen Typ II - Synthese (grün) und Kollagenabbau (rot) in Gefrierschnitten der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient K“ (Originalvergrößerung 10-fach).

Die **Abbildungen 23** und **24** zeigen die Kollagensynthese (Epitop CPII, grün) und die Kollagenspaltung (Epitop C2C, rot) von „Patient K“ bzw. „Patient A“. Im Knorpelgewebe der Kontrollgruppe des „Patienten K“ (**Abbildung 23**) ist in allen Schichten eine deutliche grüne Fluoreszenz der Chondrozyten dominierend. Teilweise finden sich auch fluoreszierende Höfe um die Knorpelzellen herum. Andeutungsweise Rotfärbungen, als Indikator von diskreter Kollagenspaltung, sind in diesem Schnitt höchstens in der oberflächlichen Knorpelzone zu erahnen. Im Gewebe, das in der Versuchsgruppe inkubiert wurde, finden sich hingegen stärker ausgeprägte rote Fluoreszenzsignale, die

auch in ihrer flächenmäßigen Ausdehnung denen im Schnitt der Kontrollgruppe deutlich überwiegen. Die grünen Signale sind erheblich schwächer ausgeprägt.

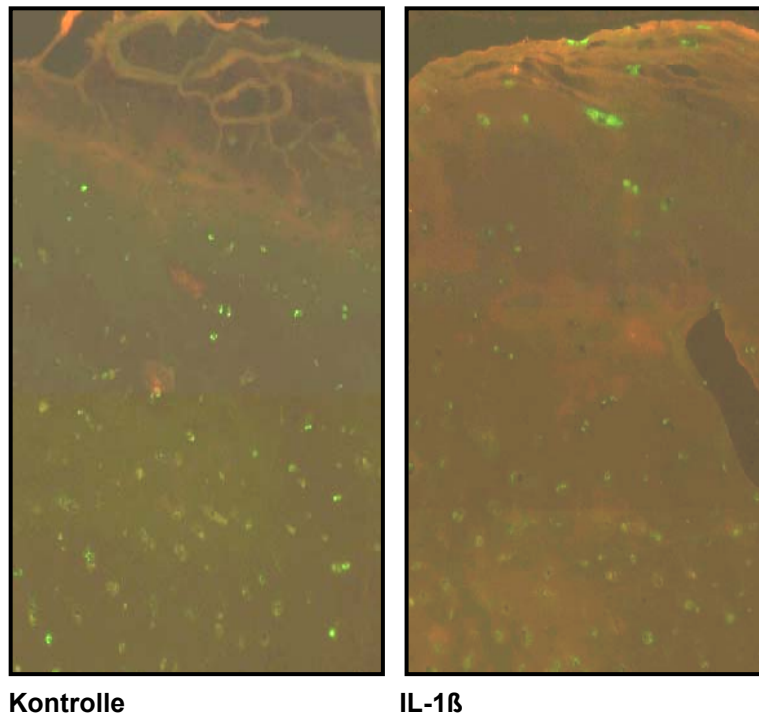


Abb. 24 *Kollagensynthese und Abbau („Patient A“)*

Kollagen Typ II - Synthese (grün) und Kollagenabbau (rot) in Gefrierschnitten der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppe von „Patient A“ (Originalvergrößerung 10-fach).

Auf den Schnittpräparaten beider Gruppen von „Patient A“ (**Abbildung 24**) zeigt sich eine mäßige grüne Fluoreszenz, die sich im Schnitt aus der Kontrollgruppe relativ homogen über alle Gewebeschichten verteilt darstellt, und im Schnitt aus der Versuchsgruppe in der oberen Knorpelschicht etwas geringer ausgeprägt erscheint. Auf beiden Präparaten findet sich keinerlei rote Fluoreszenz, die sich von der Eigenfluoreszenz des Gewebes abhebt und somit als Korrelat einer Kollagenspaltung gewertet werden kann.

Die Ergebnisse der Kollagenfärbungen gehen nur teilweise mit den Resultaten der Safranin- und Aggrekanfärbungen einher. Beim Knorpelgewebe von „Patient K“ ist nach IL-1 β Exposition eindeutig ein Überwiegen der Kollagenspaltung festzustellen, während sich bei „Patient A“ weder eine (erwartete) anabole noch eine katabole Reaktion zeigt. Die Mikroheterogenität, die sich hinsichtlich des Aggrekanstoffwechsels zeigte, lässt sich

auch bei den Darstellungen des Kollagenstoffwechsels nachvollziehen. Insbesondere die Präparate von „Patient K“ zeigen sich heterogen (vgl. Abbildung 23).

Anhand des Vergleiches der immunhistologischen Präparate der Patienten „K“ und „A“ wird zudem deutlich, welche histomorphologischen Unterschiede bei Knorpelgewebe zweier OA-Patienten des aus demselben Patientenkollektiv vorkommen. Neben der Heterogenität innerhalb des Gewebes, existiert offensichtlich auch eine beträchtliche Heterogenität zwischen den einzelnen Patienten.

3.3.2.1 Gegenüberstellung von gesundem Knorpel und OA-Knorpel

Die folgenden Abbildungen zeigen immunhistologische Präparate vom Knorpelgewebe eines Patienten mit bekannter fortgeschrittener OA sowie eines Patienten ohne OA. Beide Patienten gehören nicht dem Kollektiv der 15 Patienten aus Explantatkultur II an. Das gesunde bzw. nicht von OA betroffene Knorpelgewebe stammt von der Autopsie einer Person ohne bekannte Krankengeschichte im Hinblick auf Gelenkerkrankungen.

Abbildung 25 zeigt gesundes bzw. osteoarthrotisches Knorpelgewebe im Vergleich. Gefärbt wurden Epitop 846 (Aggrekansynthese, grün) und Epitop 1031 (Aggrekanspaltung, rot). Obwohl der Schnitt des normalen Knorpels nicht die volle Schichthöhe zeigt, ist der homogene und „geordnete Charakter“ des Gewebes deutlich erkennbar. Die Zellen des gesunden Knorpels unterliegen scheinbar geregelten Phasen von Synthese und Degradation.

Der erkrankte Knorpel wirkt dagegen heterogen und „unruhig“. Auch der vergrößerte Zellcluster macht hinsichtlich der Synthese- und Abbauleistung von Aggrecan einen asynchronen Eindruck. Die Phasen von Synthese und Spaltung sind nicht mehr nachvollziehbar.

Ähnliches lässt sich auch bezüglich des Kollagenstoffwechsels feststellen (**Abbildung 26**). Im gesunden Knorpel zeigt sich wieder der homogene Charakter in der Gewebeübersicht und eine „rhythmisch“ erscheinende phasenweise Kollagensynthese- bzw. Kollagen-degradation durch die Zellen. Die anabolen und katabolen Zelleistungen innerhalb des Chondrons wirken synchronisiert.

Diese Synchronität ist beim arthrotischen Knorpel nicht zu erkennen. Das Gewebe erscheint wiederum (mikro)-heterogen. Der Zelleib des dargestellten Chondrozyten erscheint grün, was auf den anabolen Funktionszustand der Zelle schließen lässt. Im Gegensatz zu ihrem „nichtarthrotischen Pendant“ zeigt sich bei dieser Knorpelzelle keine Rhythmik zwischen den anabolen und katabolen Leistungen.

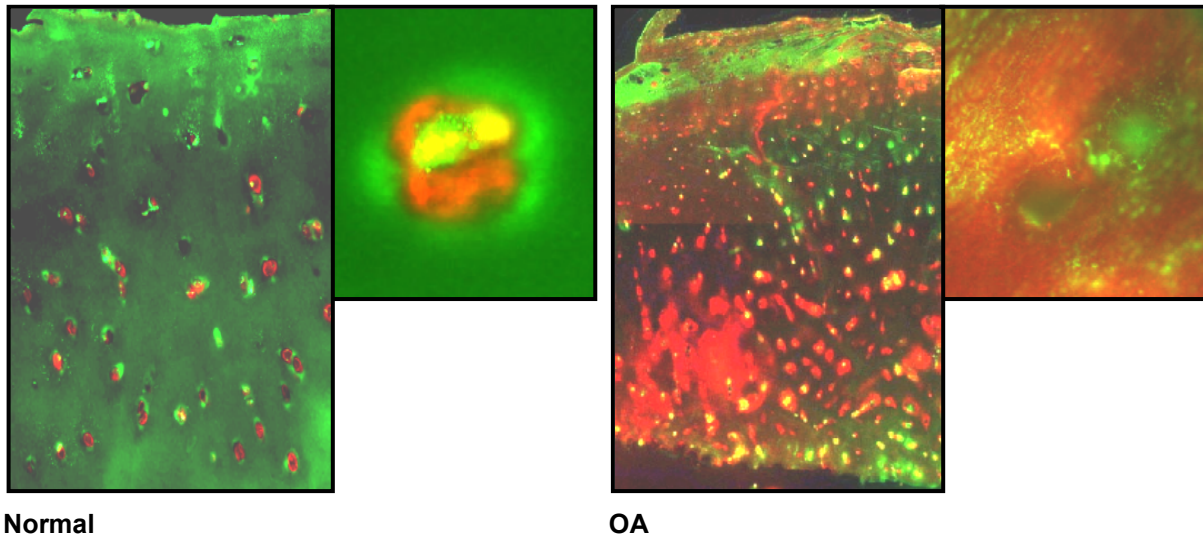


Abb. 25 Vergleich von gesundem und OA-Knorpel (Aggrekanstoffwechsel)

Aggrekansynthese (grün) und Aggrekanspaltung (rot) in normalem und osteoarthrotischem Knorpelgewebe. Ein Chondron wurde jeweils herausvergrößert. (Originalvergrößerung Gewebe: 10-fach, Zellen: 100-fach).

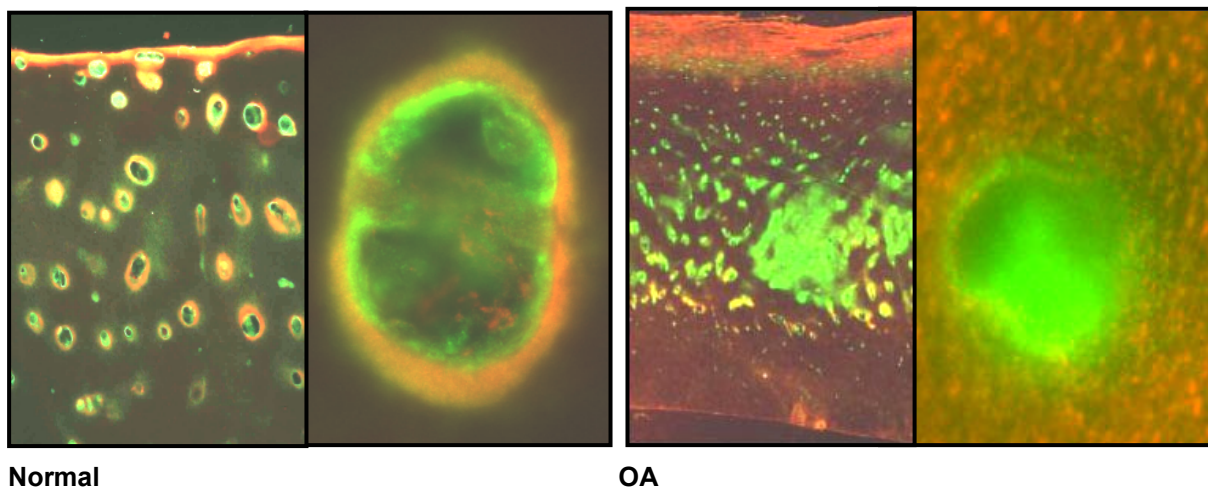


Abb. 26 Vergleich von gesundem und OA-Knorpel (Kollagenstoffwechsel)

Kollagensynthese (grün) und Kollagenspaltung (rot) in normalem und osteoarthrotischem Knorpelgewebe. Jeweils wurde ein Chondron bzw. eine Einzellzelle herausvergrößert. (Originalvergrößerung Gewebe: 10-fach, Zellen: 100-fach).

4 DISKUSSION

4.1 Methoden

Ziel der in vitro Experimente in dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von IL-1 β auf humanes osteoarthrotisches Knorpelgewebe. Da die Eigenschaften und Reaktionsweisen von Knorpelgewebe bzw. Knorpelzellen je nach der vorherrschenden Umgebung bzw. Situation (in situ oder in vitro) durchaus sehr verschieden sind [46, 113], können bei in vitro Experimenten gewonnene Erkenntnisse nie ohne Abstriche auf die in situ Verhältnisse übertragen werden. Um aus in vitro Erkenntnissen dennoch Rückschlüsse auf die nativen Verhältnisse ziehen zu können, müssen die Kultivationsbedingungen den natürlichen Gegebenheiten möglichst angepasst werden. So wurden in dieser Arbeit Knorpelgewebestücke kultiviert, wodurch die Chondrozyten von ihrer nativen Matrix umgeben bleiben. Die Matrix trägt, anders als bei isolierten Zellen, dazu bei, den funktionellen Status der Chondrozyten aufrecht zu erhalten [28, 3]. Es wurden auch Einflüsse auf die Expression kataboler Gene im Rahmen der enzymatischen Isolation von Knorpelzellen (bei in vitro Zellkultur) beschrieben [47, 133, 52]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Explantatkultur besser als die Zellkultur geeignet, die in situ Verhältnisse zu imitieren.

Zum Ausschluss der Verwendung von fehlerhaftem bzw. inaktivem IL-1 β , wurde für die 15 durchgeführten Explantatkulturen IL-1 β von zwei unterschiedlichen Herstellern eingesetzt. Die Beobachtungen, die beim Gewebe der ersten acht Patienten gemacht wurden (IL-1 β , Fa. Sigma) entsprachen denen bei den Explantaten der übrigen sieben Personen (IL-1 β , Fa. Calbiochem). Dadurch erscheint die versehentliche Verwendung einer inaktiven IL-1 Charge sehr unwahrscheinlich.

Die Höhe der IL-1 β -Konzentration wurde mit 10ng/ml so gewählt, dass sie deutlich über den Werten, wie sie in Synovialflüssigkeit von OA-Patienten gemessen wurden [112] liegt und nach gängigem Verständnis zu einer deutlichen katabolen Aktivierung mit GAG-Verlusten hätte führen sollen. Auch anabol aktivierende Einflüsse auf in vitro Kulturen durch serumhaltige Nährmedien sind bekannt und kommen als Störfaktor in Frage. Grund dafür sind Wachstumsfaktoren, die im Serum enthalten sein könnten [4]. Um dies zu vermeiden, wurde ein synthetisches, serumfreies Medium verwendet, so dass die Stoffwechselreaktionen tatsächlich auf die Behandlung mit IL-1 β zurückzuführen sind.

Einen störenden Einflussfaktor auf die Untersuchungsergebnisse stellte die unterschiedliche Ausgangslage der verwendeten Gewebe dar. Zwar wurden lediglich Explantatzylinder eines Patientenkollektives verwendet (Patienten mit Indikation zum Kniegelenkersatz), doch ist bekannt, dass mitunter große Diskrepanzen zwischen der klinischen Symptomatik und

objektivierbaren Veränderungen am Gewebe vorliegen können [24]. Hinzu kommt, dass unter den Patienten auch Unterschiede bezüglich der subjektiven Wahrnehmung der Beschwerden bestehen. Dies schlägt sich sowohl in der Medikation als auch darin nieder, ob das betroffene Kniegelenk eher geschont (z.B. durch Immobilisation) oder aber annähernd normal belastet wird. Es ist bekannt, dass Art und Umfang der Belastung eines Gelenkes beträchtlichen Einfluss auf die GAG-Synthese und damit den GAG-Gehalt des Gelenkknorpels haben kann [91].

Dennoch erfolgte aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Patientengewebe die Auswahl der einbezogenen Personen unabhängig von potentiellen Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Krankengeschichte oder Medikation. Die Gonarthrose mit bestehender Indikation zur Knie-TEP, war einziges Kriterium, Knorpel des jeweiligen Patienten zu verwenden. Auf eine detaillierte Gruppierung der Patienten musste verzichtet werden. Dies ist einer der Schwachpunkte der vorliegenden Arbeit. Ein weiterer ist die Art der Entnahme der Gewebezylinder aus dem bei der Operation entfernten Gewebe. Dabei musste einerseits Gewebe aus arthrotischen Regionen (möglichst Hauptbelastungszonen) entnommen werden, andererseits musste jedoch noch genügend Knorpelschicht vorhanden sein, um die Kultivationen und Analysen durchführen zu können. Angesichts der Tatsache, dass der Höhenverlust der Knorpelschicht ein Charakteristikum der OA im fortgeschrittenen Stadium ist [24], bestand somit ein Dilemma. Um dem beizukommen, wurde Knorpelgewebe mit annähernd gleicher Schichtdicke nahe der Hauptbelastungszonen entnommen.

Die Experimente aus „Explantatkultur I“ zeigten, dass innerhalb des Knorpelgewebes eines Patienten, abhängig von der Entfernung der Explantate, Streuungen der GAG-Gehalte bestehen („intraindividuelle Varianz“). Für die Kulturen von „Explantatkultur II“ wurden die Gewebestücke möglichst dicht nebeneinander entnommen, was zur Reduktion dieser intraindividuellen Varianz beitrug. Darauf deutet die positive Korrelation der beiden Bestimmungsmethoden der GAG-Gehalte hin (vgl. Kap. 3.2.1, Methoden a und b). Denn durch die Einbeziehung der Nullpunkte in Methode b wird sowohl die Varianz zwischen den Stanzzylindern der beiden Gruppen als auch diejenige zwischen den verschiedenen Nullpunkten relativiert.

Zur Überprüfung der Kulturbedingungen diente die Bestimmung der Anzahl der Chondrozyten im Knorpelgewebe. Dies geschah jedoch nur indirekt mittels Bestimmung der DNA-Mengen im Knorpelgewebe. Dabei wurde von gleichen DNA-Mengen pro Chondrozyt ausgegangen, um aufgrund der DNA-Gehalte auf die Zellzahlen schließen zu können. Phänomene, bei denen es zur Steigerung der DNA-Mengen pro Zelle kommt (z.B. Polyploidisierung, Proliferation) finden dabei allerdings keine Berücksichtigung, wodurch diese Methode als Mittel zur exakten Bestimmung der Anzahl von im Knorpelgewebe vorhandenen Zellen ungeeignet ist. Als Mittel zur Abschätzung der Kultivationsbedingungen

in den Experimenten dieser Arbeit erschien diese indirekte und relativ unaufwendige Methode jedoch hinreichend genau zu sein.

4.2 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit anhand der Gewebe von zwei Patienten durchgeführten immunhistologischen Darstellungen von Aggrekanssynthese und -abbau bzw. Kollagensynthese und -abbau weisen auf das Vorliegen unorganisierter, scheinbar wahllos verstreut ablaufender kataboler und anaboler Vorgänge in osteoarthrotischem Knorpelgewebe hin, was im histologischen Präparat als Mikroheterogenität imponiert. Diese Mikroheterogenität ist möglicherweise das morphologische Korrelat von Chondrozyten, die in unterschiedlichen Funktionszuständen (mosaikartig) nebeneinander existieren. Selbst innerhalb von Chondrozytenclustern bzw. Chondronen ließen sich Zellen mit verschiedenem funktionellen Status beobachten, während sich gesundes Knorpelgewebe sowohl auf zellulärer Ebene als auch in Bezug auf die Gewebsschichten homogen darstellte. Insbesondere die Behandlung des Gewebes eines der beiden für Immunfärbungen verwendeten Patienten mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β führte zu einer deutlichen Verstärkung des heterogenen Musters und nicht zu einer generellen Induktion einer katabolen Stoffwechsellaage.

Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Chondrozyten unterschiedlich auf den katabolen Stimulus durch IL-1 reagieren, wodurch die per se katabole Wirkung des Zytokins in Frage stehen würde. Die Ergebnisse der GAG-Bestimmungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass IL-1 β neben seiner bekannten katabolen Wirkung offenbar auch zu gegensätzlichen Effekten im Knorpelgewebe führen kann, bzw. Knorpelgewebe verschiedenartig auf die Anwesenheit von IL-1 β reagiert. Damit ergibt sich ein neuer Blickwinkel auf die Rolle des Zytokins bei der Entstehung und Progression der OA. Kürzlich wurde in einer Arbeit von Fan und Mitarbeitern in Zweifel gezogen, dass IL-1 ein wichtiger Mediator bei der Knorpeldestruktion im Rahmen der OA ist. Fan et al. beobachteten bei vitro Kulturexperimenten mit isolierten osteoarthrotischen Chondrozyten, dass diese gegenüber dem katabolen Reiz von IL-1 β deutlich unempfindlicher sind als ihre physiologischen Pendanten. In diesem Zusammenhang wurde neben auto- bzw. parakrinen Regulationsmechanismen auch die Möglichkeit diskutiert, dass im Rahmen der Isolationsprozedur der Chondrozyten deren IL-1 Rezeptoren zerstört worden sein könnten [32]. Diese Hypothese wird jedoch aufgrund der Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit nicht gestützt. Denn schließlich wurden hierbei Explantatkulturen verwendet, um die Wirkungen von IL-1 auf OA-Knorpel zu untersuchen, mit einem ähnlichen Ergebnis. Auch aktuelle Untersuchungen der

Genexpressionsmuster in normalen und in osteoarthrotischen Knorpelzellen deuten an, dass IL-1 β bezüglich der Expression so genannter kataboler Gene in osteoarthrotischen Chondrozyten, seiner „erwarteten Rolle“ nicht gerecht wird, es also gegenüber der Kontrolle nicht zwangsläufig zur Induktion dieser Gene kommt [5]. Indirekt bestätigt wird dies auch durch Experimente, in denen durch Antagonisten von IL-1 und TNF α nur bei einem Teil der Explantate von OA-Patienten katabole Effekte blockiert werden konnten [54].

Jedoch nicht nur das Fehlen kataboler Wirkungen sondern auch anabole Effekte von IL-1 wurden bereits beschrieben. Sowohl in Zellkulturen als auch in Explantatkulturen führte IL-1 β (aber auch TNF α , ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin) zu einem deutlichen Anstieg von BMP-2 mRNA und -Protein und zwar zusammen mit einer gesteigerten Synthese von Prokollagen Typ II als Hinweis einer anabolen Stimulation [34]. Eine anabole Stimulation durch IL-1 ist auch hinsichtlich des Stoffwechsels der Hyaluronsäure zu vermuten. Zumindest wurde unter IL-1 Einfluss die mRNA Expression zweier hyaluronsäurebildenden Enzyme (HAS2 und insbesondere HAS3) nachgewiesen [43]. Untersuchungen des Knochenstoffwechsels weisen zudem neben katabolen Effekten auch auf die Existenz anaboler IL-1 Wirkungen hin [125]. Die Möglichkeit verschiedener und voneinander unabhängiger Wirkungen von IL-1 wurde auch bezüglich des Proteoglykanstoffwechsels postuliert [6]. Im Hinblick auf die Expression von physiologischerweise knochenspezifischen Proteinen durch Chondrozyten (Osteocalcin, Osteopontin) wurde der Verlust von reguliertem Zellverhalten im Spätstadium der OA in einigen Arbeiten beschrieben [66, 85, 104, 101].

Dysregulation von Zellverhalten in OA-Knorpel scheint auch als Ursache der beobachteten Mikroheterogenität in OA-Knorpel in Frage kommen und wäre letztlich eine plausible Erklärung für das äußerst unterschiedliche (heterogene) Reaktionsverhalten der OA-Gewebe bei weiterer Stimulation durch IL-1 β , bezüglich der MMP-Expressionsprofile und der Veränderungen der GAG-Gehalte.

Die drei beobachteten Reaktionsmuster hinsichtlich der Veränderungen des GAG-Gehaltes unter der Behandlung mit IL-1 β (katabol, konstant, anabol) wären gewissermaßen als Summationen bzw. als „Nettobilanz“ unterschiedlicher zellulärer Reaktionen auf IL-1 β zu verstehen. Beim Überwiegen von Zellen, die sich in einer anabolen Phase befinden und gegenüber dem „katabolen“ Stimulus durch IL-1 β nicht vulnerabel sind, resultiert ein anaboles Reaktionsmuster, während eine Überzahl „sensitiver“ Chondrozyten zur katabolen Reaktion des Gewebes führen würde. Die Existenz unterschiedlicher zellulärer Phänotypen im OA-Knorpel bzw. das Fehlen eines generellen Phänotypwechsels bei OA-Chondrozyten wurde anhand von Untersuchungen der Expressionsmuster verschiedener Kollagentypen postuliert [35]. Möglicherweise bestätigt diese Erkenntnis die beobachteten unterschiedlichen zellulären Reaktionen im OA-Knorpel.

Beobachtungen scheinbar widersprüchlicher Daten in Bezug auf den Proteoglykanstoffwechsel sind keineswegs neu. Bereits in Untersuchungen der Vergangenheit finden sich unterschiedliche Angaben hinsichtlich der GAG-Synthese bzw. des GAG-Gehaltes in OA-Gewebe. Als Ursache dafür wurden vor allem jedoch unterschiedliche Krankheitsstadien diskutiert [68, 103, 118]. Zudem wird die Stoffwechsellage des Gewebes auch durch endogene Einflüsse, z.B. durch degradierte Matrixbestandteile moduliert. So ist für Fibronectinfragmente eine Kollagen Typ II - spaltende Wirkung beschrieben worden. Vermittelt wird dieser katabole Effekt über IL-1 [133].

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit führen zu der Hypothese, dass osteoarthrotisches Knorpelgewebe durch das Vorhandensein von Chondrozyten geprägt ist, die sich im Hinblick auf ihre Stoffwechselleistungen einer synchronisierten Regulation entziehen und mehr oder weniger autonom agieren bzw. reagieren. Dabei geht auf zellulärer Ebene die in gesunden Chondrozyten bestehende „Rhythmik“ von anabolen und katabolen Zelleistungen verloren, wodurch es zu einem unkoordinierten Wechsel von katabolen und anabolen Stoffwechsellagen kommt. Resultat ist eine Differenzierungsheterogenität, der das homogene und organisierte Erscheinungsbild von gesundem Knorpel im Verlauf der Erkrankung weicht. Möglicherweise ist, entgegen bisheriger Ansichten, nicht das Vorherrschen einer generellen katabolen Stoffwechsellage, sondern eben der Verlust der Regulation von Zelleistungen im Knorpelgewebe und die heterogene zelluläre Antwort auf katabole Stimuli (z.B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen des Gewebes) das entscheidende Charakteristikum der OA.

Aus klinisch-pharmakologischer Sicht wäre vor diesem Hintergrund verständlich, dass insbesondere in Bezug auf Wirkstoffe, mit entzündungshemmendem Wirkprofil (NSAIDs) teilweise gegenläufige Beobachtungen hinsichtlich der Laborparameter und der klinischen Symptomatik beobachtet wurden [37, 126]. Grund dafür könnte sein, dass in Folge der Heterogenität jeweils nur Subpopulationen von Zellen in entsprechend gewünschter Weise beeinflusst werden können. Als Konsequenz ist zu mutmaßen, dass es mit heutigen medikamentösen Behandlungsansätzen gar nicht gelingen kann, OA-Gewebe beispielsweise „rein anti-inflammatorisch“ oder „rein anabol“ zu behandeln, da subtile Regulationsmechanismen nicht individuell beeinflussbar sind. Somit wäre die Mikroheterogenität des OA-Gewebes eine mögliche Ursache des im klinischen Alltag beobachteten heterogenen Ansprechverhaltens der Patienten auf pharmakologische Interventionen, wobei der Behandlungserfolg davon abhängig ist, ob momentan beeinflussbare oder nicht beeinflussbare Zellpopulationen im OA-Knorpelgewebe überwiegen.

Neben dem Vorliegen der Mikroheterogenität und der Varianz der GAG-Gehalte innerhalb des Gewebes des individuellen Patienten, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass bezüglich der GAG-Gehalte große Variabilitäten unter den verschiedenen Patientengeweben herrschen. Vor diesem Hintergrund ist verständlich, dass das Knorpelgewebe der einbezogenen 15 Patienten keinesfalls ausreichend ist, um das ganze Spektrum der Patienten mit fortgeschrittener OA und deren Reaktion auf eine katabole Stimulation zu erfassen. Und selbstverständlich sind die beiden Patienten, mit deren Gewebe immunhistologische Färbungen durchgeführt werden konnten, lediglich als Beispiele anzusehen (auch wenn inzwischen ähnliche Ergebnisse im Rahmen einer anderen Studie unserer Abteilung auch im Knorpelgewebe arthrotischer Sprunggelenke erhalten wurden [Aurich, Mollenhauer et al. – persönliche Mitteilung]).

Somit lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit meiner Überzeugung nach keine Schlussfolgerungen ziehen, anhand derer sich konkrete oder gar allgemeine Empfehlungen für den Umgang mit der OA hinsichtlich der Diagnostik oder Therapie im klinischen Alltag ableiten ließen. Vielmehr führen die Ergebnisse eindeutig vor Augen, dass es sich bei der OA um ein vielgestaltiges und individuell geprägtes Krankheitsbild handelt. Angesichts dessen wird die Notwendigkeit deutlich, solche oder ähnliche Untersuchungen an wesentlich größeren und möglichst detailliert stratifizierten (nach Krankengeschichte, Alter, Geschlecht, OA-Stadium, Medikation, etc.) Patientenkollektiven durchzuführen, um die Vielfalt der Ausprägungen erfassen und möglicherweise auf gruppenspezifische Merkmale zurückführen zu können. Vor dem Hintergrund der mitunter oft jahrelangen klinisch inapparenten Phase der OA [95] erscheint es zudem unverzichtbar, den zeitlichen Beginn histomorphologischer Veränderungen im Knorpelgewebe zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang besteht jedoch insofern ein Problem, als dass humanes Knorpelgewebe im Regelfall nur in weit fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (durch Ersatzoperationen) für experimentelle Zwecke verfügbar ist. Angesichts dessen dürfte auch zukünftig dem Einsatz geeigneter Tiermodelle zur Erforschung der OA große Bedeutung zukommen. Aufgrund der histologischen Beobachtungen aus dieser Arbeit scheint es jedoch in erster Linie empfehlenswert zu sein, den Fokus von Forschungsbemühungen insbesondere auf den Verlust von Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene zu richten, um das Wesen und die Ursache der verschiedenen funktionellen Zustände von Knorpelzellen zu ergründen und damit hoffentlich dem Verständnis der komplexen Erkrankung Osteoarthritis näher zu kommen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland gilt die Osteoarthritis als die am häufigsten auftretende altersassoziierte degenerative Erkrankung, so dass man ohne Übertreibung von einer Volkskrankheit sprechen kann. Die Symptome reichen von Schmerzen über Bewegungseinschränkungen und Deformitäten bis hin zur völligen Einsteifung der betroffenen Gelenke im Extremfall. Bei den peripheren Gelenken kommt unter anderem der Kniegelenkarthrose (Gonarthrose) große klinische Bedeutung zu. Neben vielen symptomatischen Behandlungsstrategien ist momentan in der Implantation prothetischer Systeme die einzige kausale Therapie der Osteoarthritis zu sehen. Vor diesem Hintergrund besteht großes Interesse an Wirkstoffen, die in der Lage sind, die Erkrankung zum Stillstand zu bringen oder gar zu heilen. Voraussetzung dafür ist jedoch ein umfassendes Verständnis der sich im gesunden und im erkrankten Knorpelgewebe abspielenden Vorgänge.

Vor allem dem Zusammenspiel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird eine entscheidende Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei der Progression der Osteoarthritis zugeschrieben. Besonders in Bezug auf das Zytokin Interleukin-1 sind katabole Effekte auf Stoffwechselvorgänge gesunder Chondrozyten in verschiedenen Arbeiten belegt. Untersuchungen aus jüngerer Vergangenheit deuten jedoch an, dass sich diese Wirkungen im Fall von osteoarthrotischem Knorpelgewebe nicht uneingeschränkt bestätigen lassen und die exakte Rolle von Interleukin-1 im osteoarthrotischen Krankheitsgeschehen nach wie vor unklar ist.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung des Zytokins Interleukin-1 β auf den katabolen und den anabolen Stoffwechsel von humanem osteoarthrotischen Knorpelgewebe unter in vitro Kulturbedingungen.

Dafür wurde im Rahmen von Knieprothesenimplantationen entferntes Knorpelgewebe von Patienten (n=15) mit fortgeschrittener Kniegelenkarthrose gesammelt. Anschließend wurden Explantatzylinder mit definiertem Durchmesser aus dem Gewebe entnommen und in vitro kultiviert. Ein synthetisches Medium diente als Nährlösung. Die Medien der Versuchsgruppen enthielten rekombinantes humanes Interleukin-1 β (10ng/ml). Nach Beendigung der Kultivationen erfolgte die Beurteilung der Explantate aus Kontroll- und Versuchsgruppen im Hinblick auf den Glykosaminoglykangehalt mittels eines photometrischen Verfahrens (1,9-Dimethylmethylenblau-Assay) sowie der Nachweis der Matrix-Metallo-Proteinase-2 und -9 in den Mediumüberständen durch Gelatinezymographie. Im Gewebe zweier ausgewählter Patienten wurden mit immunhistologischen Verfahren Synthese- und Abbauvorgänge des

Glykosaminoglykane Aggrecan und des Kollagens Typ II (beides strukturelle Hauptkomponenten von Gelenkknorpel) sichtbar gemacht. Dabei zeigten sich Hinweise für unsynchronisierte und dysregulierte Abläufe hinsichtlich der Stoffwechselleistungen von Knorpelzellen im osteoarthrotischen Knorpelgewebe (Mikroheterogenität). Verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen fielen bei Interleukin-1 β -Behandlung außerdem, sowohl in Bezug auf Veränderungen des Gehaltes an Glykosaminoglykanen als auch hinsichtlich der Expressionsmuster von Matrix-Metallo-Proteinasen, unterschiedliche Reaktionen der verwendeten Explantatgewebe auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die beobachtete Mikroheterogenität, bzw. die ihr zu Grunde liegenden unterschiedlichen funktionellen Zustände der Knorpelzellen (katabol, anabol) sowie der Verlust von Regulation, als Ursache der beobachteten unterschiedlichen Reaktionen der untersuchten Patientengewebe auf die in vitro-Behandlung mit Interleukin-1 β in Frage kommt. Auch die in der klinischen Praxis zu beobachtenden heterogenen Reaktionsweisen der Patienten auf pharmakologische Interventionen könnten zum Teil durch dieses Phänomen begründet sein.

Alles in allem unterstreichen die Resultate dieser Arbeit deutlich den komplexen Charakter bzw. die Vielgestaltigkeit der Erkrankung und führen die Notwendigkeit exakter Stratifizierungen von Patientengruppen bei zukünftigen Untersuchungen vor Augen. Die Mikroheterogenität im Knorpelgewebe von Gonarthrosepatienten scheint ein interessantes und womöglich bedeutendes Charakteristikum der Osteoarthrose zu sein, dem weiterführende Forschungsanstrengungen gewidmet werden sollten. Angesichts der Beobachtungen aus dieser Arbeit, ist dabei wohl besonderes Augenmerk auf den Verlust zellulärer Regulationsmechanismen zu richten, welcher im Rahmen des Krankheitsgeschehens der Osteoarthrose bedeutungsvoll zu sein scheint.

6 MATERIALIEN

6.1 Puffer, Lösungen, Ansätze und Kulturmedien

DMB – Assay :

DMB Reagenz	16 mg 1,9-DMB in 5 ml Ethanol, 2 ml Ameisensäure und 2 g Natriumformiat in 20 ml aqua dest. lösen beide Ansätze vereinen, mit H ₂ O auf 1 l mit Natriumhydroxid auf pH 6,8 einstellen
DMB Standard	DMB Stammlösung : 20 µg/ml in Verdün- nungspuffer
Verdünnungspuffer	0,05 M Natriumacetat 0,05% Tween 20 in 500 ml Reinstwasser, pH 6,8
Guanidin Hydrochlorid – Natriumacetat	2,88 M Guanidinhydrochlorid mit 0,05 M Natriumacetat auf 100ml auffüllen, pH 6,8 einstellen

DNA – Assay :

Hoechst Farbstoffpuffer	20 mM Tris 1 mM Natrium-EDTA 100 mM Natriumchlorid mit Reinstwasser auf 500 ml auffüllen, pH 7,0
Hoechst Farbstofflösung	2 mg Farbstoff in 1 ml DMSO gelöst Lagerung bei 4° Celsius im Dunkeln
Stamm-DNA (highly polymerized)	10 µg/ml DNA in Farbstoffpuffer
Gebrauchslösung	Hoechst-Farbstoff 1:100000 in Farbstoffpuffer

Immunhistologie :

Anti-Prokollagen IgG (AK CPII) und Anti-Kollagen-Spaltprodukt IgG (AK C2C)	beide AK sind 1:10 in Albumin-Trispuffer vorverdünnt, zu 30 µl aliquotiert und bei -21° Celsius gelagert worden Verdünnung der Aliquots (1:10) in Albumin- Trispuffer, Zentrifugation
Anti-Aggrekan IgG (AK 846)	Verdünnung 1: 500 in Albumin-Trispuffer, Zentrifugation
Anti-Aggrekan-Spaltprodukt IgG (AK 1031)	Verdünnung 1: 44 in Albumin-Trispuffer, Zentrifugation
Fluoreszein anti-mouse IgG, Alexa Flur 488 anti-rabbit IgG, Alexa Flur 594 anti-mouse IgG	Verdünnung 1:100 in Albumin-Trispuffer
Alexa Flur 594 anti-rabbit IgG	Verdünnung 1:200 in Albumin-Trispuffer

Nährmedien und Zusätze :

DMEM	13,42 g/l Trockenpulver 44 mM Natriumhydrogencarbonat Lösung in Reinstwasser pH-Einstellung mit 4 M HCl auf 7,4
FKS	zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erfolgte eine Hitzeinaktivierung (30 min bei 56° Celsius)
ITS	Insulin (5mg/ml) Transferrin (5mg/ml) Selenium (5µg/ml)

FKS – Medium	DMEM FKS (50µg/ml) Gentamycin (50µg/ml) ACC (5µg/ml)
ITS1 – Medium	DMEM ITS (1: 1000) Gentamycin (50µg/ml) ACC (5µg/ml)
ITS2 – Medium	DMEM ITS (1: 10 000) Gentamycin (50µg/ml) ACC (5µg/ml)
ITS3 – Medium	DMEM ITS (1: 100 000) Gentamycin (50µg/ml) ACC (5µg/ml)
IL-1 β (rhIL-1 β , E.coli)	gefriergetrocknet geliefert, Lösung in PBS mit 0.1 % BSA (1µg/ml), Aliquotierung, Lagerung bei -80° Celsius
Pufferlösungen :	
Albumin-Trispuffer	0,5 g Albumin Fraktion V 16,6 ml TBS
PBS	10,1 mM Natriumhydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid 137 mM Natriumchlorid in Reinstwasser lösen und mit 5 N Natriumhydroxid auf pH 7,4 einstellen, Endvolumen: 1 l, autoklavieren

TBE, 5fach	0,5 M TBS 0,5 M Borsäure 10 mM Natrium-EDTA mit aqua dest. auf 1 l auffüllen
Trispuffer (TBS)	60 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 90 g Natriumchlorid mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Safranin O-Färbung :	
Safraninlösung	Verdünnung 1:3 in aqua dest., vor Verwendung Filtration durch Filterpapier
Lichtgrün	Verdünnung 1:3 in aqua dest., vor Verwendung Filtration durch Filterpapier
Zymographie :	
Gelatine-Gel	1,5 ml Acrylamid-Mix (30% Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid) 1,86 ml 1,5 M Tris/HCL, pH 8,8 1,71 ml aqua dest. 1,86 ml Gelatine-Lösung (2 mg/ml Gelatine; in Mikrowelle erhitzt) 41,8 µl APS (10 %) 5,35 µl TEMED
Sammel-Gel	500 µl Acrylamid-Mix (30% Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid) 1,25 ml 0,5 M Tris/HCL, pH 6,8 50 µl SDS (10 %) 3,15 ml aqua dest. 50 µl APS (10 %) 5,35 µl TEMED
Gel-Equibrilationspuffer	2,5 % Triton in aqua dest.

Gel-Inkubationspuffer	50 mM Tris 10 mM Kalziumchlorid 0,02 % Natriumazid 0,15 M Natriumchlorid auf pH 7,5 titrieren
Ladepuffer (zweifach, nicht reduziert)	1,2 ml aqua dest. 0,05 M Tris/HCL pH 6,8 2 ml SDS (10%) 2 ml Glycerin 0,05 % Bromophenolblau
Coomassie R+G	0,2 % Coomassie R250 0,2 % Coomassie G250 20 % Methanol 5 % Essigsäure 25 % aqua dest.

6.2 Chemikalien für Zellkultur, Antikörper usw.

2-Propanol	E. Merck, Darmstadt
Acrylamid	E. Merck, Darmstadt
AK 1031 (Wirt: Kaninchen, Kat. Nr. AB1031)	Chemicon International
AK 846 (Wirt: Maus)	Prof. Robin Poole, Montreal (Kanada)
AK C2C (Wirt: Maus)	Prof. Robin Poole, Montreal (Kanada)
AK CPII (Wirt: Kaninchen)	Prof. Robin Poole, Montreal (Kanada)
Albumin Fraktion V (aus Rinderserum, BSA)	E. Merck, Darmstadt
Alexa Flur 488 anti-rabbit IgG (Kat. Nr. A11008)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Alexa Flur 594 anti-mouse IgG (Kat. Nr. A11032)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Alexa Flur 594 anti-rabbit IgG (Kat. Nr. A11012)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Ameisensäure	E. Merck, Darmstadt
APS	E. Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	E. Merck, Darmstadt
Borsäure	E. Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	E. Merck, Darmstadt

Canada Balsam®	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
Chondroitinase ABC	Sigma, Deisenhofen
Coomassie® Brillantblau G250 und R250	E. Merck, Darmstadt
DMEM (Kat. Nr. D5648)	Sigma, Steinheim
DMSO	E. Merck, Darmstadt
DNA-Standard (aus Kalbsthymus)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	E. Merck, Darmstadt
Essigsäure	E. Merck, Darmstadt
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (Kat. Nr. 40Q401K)	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Fluoreszein anti-mouse IgG (Kat. Nr. F2761)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Gelatine	E. Merck, Darmstadt
Gentamycin	Sigma, Steinheim
Glycerol	E. Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	E. Merck, Darmstadt
Interleukin-1 β (Kat. Nr. I9401)	Sigma, Steinheim
Interleukin-1 β (Kat. Nr. 407615)	Calbiochem, San Diego
Isopropanol	E. Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
L-Cystein	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
Lichtgrün	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Methanol	E. Merck, Darmstadt
Natriumacetat	E. Merck, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumformiat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	E. Merck, Darmstadt
Papain (aus <i>Carica papaya</i>)	E. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	E. Merck, Darmstadt
ProLong ® Antifade-Kit	Molecular Probes, Eugene (USA)
Roti®-Mark Standard	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Safraninlösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
SDS	E. Merck, Darmstadt
TEMED p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Tissue-Tek®	Sakura, Niederlande
Tris	E. Merck, Darmstadt
Triton® X-100	E. Merck, Darmstadt
Tween-20	E. Merck, Darmstadt
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

6.3 Laborgeräte, Instrumente

Analysenwaage Sartorius BP 121 S	Sartorius, Göttingen
BIOTEK Instruments S F M 25	BIOTEK, Bad Friedrichshall
Brutschrank, NCO2	MEMMERT, Schwabach
Digitalkamera AxioCam	Carl Zeiss, Jena
Eismaschine (FRIMON AF 80)	Scotsman, Mailand
Eppendorf Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Fluor-S™ – Multimager	BIORAD, München
Gefriermikrotom Leica CM 1100	Leica, Nussloch
Gel Kammer (Mini-Sub-Cell GT)	BIORAD, München
Geldokumentation	BIORAD, München
Geldokumentation, BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Glasgefäße	Schottglas, Jena
Heizer, ThermoStat plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Magnetrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Microflow Laminar Flow Workstation	Nunc, Wiesbaden
Mikrowelle KOG-5747	Daewoo, Butzbad
pH-Meter HI 8014	HANNA instruments, Kehl am Rhein
Pumpe (für Mediumzubereitung)	Millipore, Eschborn
Reinstwassersystem TKA-LAB Typ HP 6	TKA, Niederelbert
Research® Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rundstanze (3mm)	Aesculap, Tuttlingen
Schüttelinkubator UNIMAX 1010	Heidolph Instruments, Kelheim
Stromversorgung, Power Pac 300	BIORAD, München
Tischautoklav	Certoclav sterilizer GmbH, Traun
Waage, Kern GS 4100/2	TECHLAB, Erkerode
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach

6.4 Verbrauchsmaterialien

Einmal - Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Einmalhandschuhe	Danz GmbH, Wetter
Objektträger Superfrost Plus, beschichtet	Menzel GmbH und Co.KG, Braunschweig
Petrischalen (unbeschichtet)	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Platten im 96, 48, 12well-Format	Nunc, Wiesbaden
Polypropylengefäße 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
ProLong® Antifade-Kit	MoBiTec, Göttingen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) ..	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
serologische Pipetten	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter (0,2µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Stickstoff, flüssig	Linde AG, Höllriegelskreuth
Tissue-Tek® O.C.T. compound™	Sakura Finetek GmbH, Heppenheim
Trockeneis	Chemiewerke, Leuna
Wägebapier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

6.5 Computersoftware

Acrobat 7.0 Professional	Adobe (Deutschland, München)
AxioVision 4.4	Carl Zeiss, Jena
AxioVision Viewer V 02-2000	Carl Zeiss, Jena
Endnote 8.0.2	Thomson ISI ResearchSoft, Philadelphia
Microsoft Office Professional Edition 2003	Microsoft (Deutschland, Unterschleißheim)
Photo Deluxe 3.0	Adobe (Deutschland, München)
Photoshop 5.5	Adobe (Deutschland, München)
Quantity One	BIORAD, München
Sigma Plot 8.0	Systat Software Inc.
Sigma Stat 3.0	Systat Software Inc.
Windows 2000 Professional	Microsoft (Deutschland, München)

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Aigner T, Bertling W, Stöss H
Independent expression of fibril-forming collagens I, II and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage.
J Clin Invest 91:829, 1993
- [2] Aigner T, Dietz U, Stöss H, von der Mark
Differential expression of collagen types I, II, III and X in human osteophytes.
Lab Invest 73:236, 1995
- [3] Aigner T, Dudhia J
Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis : a hypothesis.
Ann Rheum Dis 56:1-5, 1997
- [4] Aigner T, Glückert K, von der Mark K
Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions.
Osteoarthritis Cartilage 5:183-9, 1997
- [5] Aigner T, McKenna L, Zien A, Fan Z, Gebhard PM, Zimmer R
Gene expression profiling of serum- and interleukin-1beta-stimulated primary human adult articular chondrocytes – a molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor.
Cytokine 31:227-40, 2005
- [6] Arner EC, Pratta MA
Independent effects of interleukin-1 on proteoglycan breakdown, proteoglycan-synthesis, and prostaglandin E2 release from cartilage in organ cultures.
Arthritis Rheum 32(3):288-97
- [7] Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE
Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism.
Connect. Tissue Res. 18:223, 1988
- [8] Aydelotte MB, Kuettner KE
Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production
Connect. Tissue Res. 18:205, 1988
- [9] Aydelotte MB, Raiss RX, Caterson B, Kuettner KE
Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes.
Connect Tissue Res 28:142

- [10] Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T
Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro.
Arthritis Rheum 46:2648-57, 2002
- [11] Benton HP, Tyler JA
Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1.
Biochem Biophys Res Commun 154:421-8, 1988
- [12] Benya PD, Schaffer JD
Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotyp when cultured in agarose gels.
Cell 30:215-224, 1982
- [13] Böhme K, Winterhalter KH, Bruckner P
Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor- β 2 and basic fibroblast growth factor in synergy
Exp. Cell. Res. 216, 191-198, 1995
- [14] Canalis E
Cartilage growth factors
Triangle 27:11-17, 1985
- [15] Caplan AI, Peshak DG
The cellular and molecular embryology of bone formation.
Bone Min Res, 5:117, 1987
- [16] Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA
Microdetermination of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in the Presence of Guanidine Hydrochloride
Analytical Biochemistry 161, 103-108, 1987
- [17] Chevalier X, Groult N, Larget-Piet B
Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 37:1013, 1994
- [18] Chu ML, de Wet WJ, Bernard M, Ramirez F
Fine structural analysis of the human pro- α 1(I) collagen gene.
J Biol Chem 260:2315-2320, 1985
- [19] Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J
Human articular chondrocytes express osteogenic protein-1.
J Histochem Cytochem 48:239-50, 2000
- [20] Cibere J, Thorne A, Kopec JA, Singer J, Canvin J, Poole AR
Glucosamine sulfate and cartilage type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis: randomized discontinuation trial results employing biomarkers.
J Rheumatol 32:896-02, 2005

- [21] Cole AA, Kuettner KE
MMP-8 (neutrophil collagenase) mRNA and aggrecanase cleavage products are present in normal and osteoarthritic human articular cartilage.
 Acta Orthop Scand 66:98-102, 1995
- [22] Cooke TDV, Sumia M, Elliott S, Maeda M
Immune complex mediated destruction of cartilage in antigen induced arthritian rabbits.
 J Rheumatol Suppl 11:103, 1983
- [23] Denhardt, D.T., Feng, B., Edwards, D.R. et al.
Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions.
 Pharmacol Ther 59:329, 1993
- [24] Denk H, Bruder E, Heitz PhU
Gelenke
 In: Pathologie (Böcker W, Denk H, Heitz PhU)
 Urban & Fischer Verlag München, 983-995, 2001
- [25] Derfus BA, Rachow JW, Mandel NS
Articular cartilage vesicles generate calcium phosphate dihydrate-like crystals in vitro.
 Arthritis Rheum 35:231, 1992
- [26] Dingle JT, Horner A, Shield M
The sensitivity of synthesis of human cartilage matrix to inhibition by IL-1 suggests a mechanism for the development of osteoarthritis.
 Cell Biochem Funct 9:99-102, 1991
- [27] Dustmann HO, Puhl W, Krempien P
Die Zellteilung im Gelenkknorpel
 Arch. Orthop. Unfall-Chirurgie 79:171-82, 1974
- [28] Eger W, Schumacher BL, Mollenhauer J, Kuettner KE, Cole AA.
Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences.
 J Orthop Res 20(3):526-34, 2002
- [29] Eyre DR
The collagens of articular cartilage
 Seminar Arthritis Rheumatology, 21(3):2-11, 1991
- [30] Eyre DR, Wu JJ, Apone S
A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types.
 J Rheumatol 14:25-7, 1987

- [31] Eyre DR, Wu JJ, Woods P
Cartilage specific collagens: Structural studies
In: Articular Cartilage and Osteoarthritis (Ed. Kuettner, K.E., Peyron, J.G., Schleyerbach, R., Hascall, V.C.)
Raven Press, New York, 119-131, 1992
- [32] Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T
Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta.
Arthritis Rheum 52(1):136-43, 2005
- [33] Forster T
Krankheitskostenrechnung für Deutschland
In: Wirtschaft und Statistik
Statistisches Bundesamt 1432-1436, 2004
- [34] Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ
Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes.
J Bone Joint Surg Am 85(3):59-66, 2003
- [35] Gebhardt PM, Gehrsitz A, Bau B, Soeder S, Eger W, Aigner T
Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes.
J Orthop Res 21(1):96-101, 2003
- [36] Goldring MB, Birkhead JR, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM
Interleukin-1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes.
J Clin Invest 82:2026-37, 1988
- [37] Gonzalez E, de la Cruz C, de Nicolas R, Egidio J, Herrero-Beaumont G
Long-term effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the production of cytokines and other inflammatory mediators by blood cells of patients with osteoarthritis.
Agents Actions 41:171-8, 1994
- [38] Handley CJ, McQuillan DJ, Campbell MA, Bolis S
Steady-state metabolism in cartilage explants.
In: Articular cartilage biochemistry (Kuettner KE, Schleyerbach S, Hascall VC)
New York Raven Press 163-179, 1986
- [39] Haraoui B, Pelletier JP, Cloutiern JM, Faure MP, Martel-Pelletier J
Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of anirheumatic drugs.
Arthritis Rheum 34:153-63, 1991

- [40] Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J
The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage
 Eur J Clin Chem Clin Biochem 32:249, 1994
- [41] Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, et al.
The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1 induced damage than the deeper layers.
 Arthritis Rheum 39:478, 1996
- [42] Häuselmann HJ, Oppliger L, Michel BA
Nitric oxide and proteoglycan synthesis by human articular chondrocytes.
 FEBS Lett 352:361, 1994
- [43] Hiscock DR, Caterson B, Flannery CR
Expression of hyaluronan synthases in articular cartilage.
 Osteoarthritis Cartilage 8(2):120-6, 2000
- [44] Hofer U, Chiquet-Ehrismann R
Tenascin variants: Ligands and expression.
 Prog Clin Biol Res 383B:455, 1993
- [45] Holm S, Maroudas A, Urban JPG
Nutrition of the vertebral disc: Solute transport and metabolism.
 Conn Tissue Res 8:101, 1981
- [46] Holtzer H, Abbott J, Lash JW, Holtzer S
The loss of phenotypic traits by differentiate cells in vitro
 In: Dedifferentiation of cartilage cells
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 1533-1542
- [47] Homandberg GA, Wen C
Exposure of cartilage to a fibronectin fragment amplifies catabolic processes while also enhancing processes to limit damage.
 J Orthop Res 16:237-46, 1998
- [48] Huch K, Wilbrink B, Flechtenmacher J, Koepp HE, Aydelotte MB, et al.
Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandin E2, and interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1beta.
 Arthritis Rheum 40(12):2157-61, 1997
- [49] Hulth A
Does osteoarthritis depend on growth of the mineralized layer of cartilage?
 Clin Orthop 287:19, 1990

- [50] Jahn B, Burmester GR, Schmid HJ
Changes in cell surface antigen expression on human articular chondrocytes induced by gamma-interferon.
 Arthritis Rheum, 29:1, 1986
- [51] Jakob M, Démartheau O, Schäfer D, Stumm M, Heberer M, Martin I
Enzymatic digestion of adult human articular cartilage yields a small fraction of the total available cells.
 Connect Tissue Res 44:173-180, 2003
- [52] Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J
The effects of collagen fragments of the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes.
 Connect Tissue Res 42:71-86, 2001
- [53] Kim YJ, Doong JY, Grodzinsky AJ
Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258.
 Anal Biochem 174:168-76, 1988
- [54] Kobayashi M, Squires GR, Aisha M, Tanzer M, Feige U, Poole AR
Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degeneration of human osteoarthritic cartilage.
 Arthritis Rheum 52:128-135, 2005
- [55] Kosher RA
The chondroblast and the chondrocyte.
 In: Cartilage: Structure, function, and biochemistry (Hascall H et al.)
 Academic Press Inc., Orlando, Vol. 1, 59-80, 1983
- [56] Kreitner KF
Diagnostische Radiologie von Knochen, Gelenken und Weichteilen
 In: Einführung in die radiologische Diagnostik (Thurn P, Bücheler E, Lackner KJ, Thelen M)
 Georg Thieme Verlag 61-224, 1998
- [57] Kuettner KE
Cartilage integrity and homeostasis.
 In: Rheumatology. Mosby, London, UK, 7.6.1-16, 1994
- [58] Kuettner KE
Biochemistry of articular cartilage in health and disease.
 Clin Biochem 25:155, 1992
- [59] Kühn K
The collagen family – variations in the molecular and supermolecular structure.
 Rheumatology 10:29-69, 1986
- [60] Kwan APL, Cummings CE, Chapman JA, Grant ME
Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro.
 J. Cell Biol. 114, 597-604, 1991

- [61] Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ
Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage.
J Rheumatol 4:4, 1977
- [62] Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerrner LA
Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic and rheumatic joints.
J Clin Invest 100:93-106, 1997
- [63] Lash JW, Vasan NS
Glycosaminoglycans of cartilage.
In: Cartilage: Structure, function and biochemistry (Hascall H et al.)
Academic Press Inc., Orlando, Vol. 1, 215-243
- [64] Laurent TC, Fraser JRE
Hyaluronan.
FASEB J 6: 2397, 1992
- [65] Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G
Modulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes.
Biochem Biophys Acta 1052:366-78, 1990
- [66] Lian JB, McKee MD, Todd AM, Gerstenfeld LC
Induction of bone-related proteins osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro.
J Cell Biochem 52:206-219, 1993
- [67] Löffler G
Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen
In: Biochemie und Pathobiochemie (Löffler G, Petrides PE)
Springer Verlag 762-84, 122-30, 1998
- [68] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A
Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips: 2. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.
J Bone Jt Surg 53:523-537, 1971
- [69] Mansour JM, Mow VC
The permeability of articular cartilage under compressive strain and high pressures.
J Bone Joint Surg Am, 58:509, 1976
- [70] Mansson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, Heinegard D
Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism.
J Clin Invest 95(3):1071-7, 1995

- [71] Maroudas A
Biophysical properties of collagenous tissue.
Biorheology 12:233-248, 1975
- [72] Maroudas A, Katz EP, Wachtel EJ
Physicochemical properties and functional behavior of normal and osteoarthritic human cartilage.
In: Articular Cartilage Biochemistry (Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall V)
Raven Press, 311-330, 1986
- [73] Martinek V
Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels.
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 54, Nr. 6, 2003
- [74] Mayne R
Cartilage Collagens: What is there function and are they involved in articular diseases?
Arth. Rheum. 32: 241-246, 1989
- [75] Mayne R, von der Mark K
Collagens of cartilage
In: Cartilage: Structure, function and biochemistry (Hascall H et al.)
Academic Press Inc., Orlando, Vol. 1, 181-214, 1983
- [76] Mender M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH and Bruckner P
Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI.
J. Cell Biol. 108:191-197, 1989
- [77] Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE
Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor κ B: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3.
Arthritis Rheum 43:801-11, 2000
- [78] Mok SS, Masuda K, Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ
Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools.
J Biol Chem 269(52):33021-7, 1994
- [79] Moll KJ, Moll M
Allgemeine Anatomie und Histologie
In: Anatomie (Moll KJ, Moll M)
Gustav Fischer Verlag 39-119, 1997
- [80] Mollenhauer JA, Kuettner KE
Articular Cartilage
In: Principles of Orthopaedic Practice (Dee R, Hurst L, Gruber M, Kottmeier S)
McGraw-Hill 85-94, 1997

- [81] Mow VC, Ateshian GA, Spilker RL
Biomechanics of diarthroidal joints: A review of twenty years of progress.
J Biomech Eng 115:460, 1993
- [82] Myers JC, and Mow VC
Biomechanics of cartilage and its response to biomechanical stimuli.
In: Cartilage: Structure, function and biochemistry (Hascall, H. et.al., eds.)
Academic Press Inc 1:253-273
- [83] Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF
Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases.
In: Matrix Metallo Proteinases and Inhibitors (Birkedal-Hansen H, Werb Z, Welgus H, Van Wart H)
Gustav-Fischer-Verlag, New York, 421-424, 1992
- [84] Neame PJ, Barry FP
The link proteins.
EXS 70:53, 1994
- [85] Neugebauer BM, Moore MA, Broess M, Gerstenfeld LC
Characterisation of structural sequences in the chicken osteocalcin gene: expression of osteocalcin by maturing osteoblasts and by hypertrophic chondrocytes in vitro.
J Bone Miner Res 10:157-163, 1995
- [86] Niethard FU, Pfeil J
Degenerative Gelenkerkrankungen
In: Orthopädie (Niethard FU, Pfeil J)
Hippokrates-Verlag, 190-196, 1997
- [87] Oegma TR Jr, Thompson RC Jr
Metabolism of chondrocytes derived from normal and osteoarthritic human cartilage.
In: Articular Cartilage Biochemistry. (Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC)
Raven Press 257-272, 1986
- [88] Oegma TR, Thompson R
Cartilage-bone interface (tidemark).
In: Cartilage Changes in Osteoarthritis. (Brandt K)
Indiana School of Medicine Publishers, 43-52, 1990
- [89] Oguri S, Motegi K, Iwakura Y, Endo Y
Primary role of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced hypoglycemia in mice.
Clin Diagn Lab Immunol 9:1307-12, 2002
- [90] Otte P
Basic metabolism of articular cartilage.
Z Rheumatol 50:304, 1991

- [91] Palmoski M, Perricone E, Brandt KD
Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization.
Arthritis Rheum 22:508-17, 1979
- [92] Paulson M
The cartilage proteoglycan aggregate: Assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions.
Biophys Chem 50:113, 1994
- [93] Petit B, Masuda K, D'Souza A
Comparative studies of the rate of formation, compartmentalization and crosslinking of the collagenous network formed by fetal and adult articular chondrocytes in vitro.
Trans Orthop Res Soc 20:405, 1995
- [94] Pfander D, Heinz N, Rothe P, Carl HD, Swoboda B
Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin-1 β : a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis.
Annals Rheumatic Diseases 63:240-244, 2004
- [95] Pientka L
Arthrose als Volkskrankheit
J Clin Res 2-3, 2000
- [96] Poole AR, Rosenberg LC
Chondrocalcin and the calcification of cartilage: A review.
Clin Orthop 208:114, 1986
- [97] Poole CA, Ayad S, Gilbert RT
Chondrons from articular cartilage. Immunohistochemical evaluation of the type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy.
J Cell Sci 103:1101-1110, 1992
- [98] Poole CA, Flint MH, Beaumont BW
Chondrons in cartilage: Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages.
J Orthop Res 5:509, 1987
- [99] Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR
Chondrons from articular cartilage: Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage.
Arthritis Rheum 34:22, 1991
- [100] Pullig O, Pfander D, Swoboda B
Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression.
In: Der Orthopäde 30:825-833, 2001
Springer-Verlag

- [101] Pullig O, Weseloh G, Ronneberger DL, Käkönen SM, Swoboda B
Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: Expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.
 Calcif Tissue Int 67:230-240, 2000
- [102] Pullig O, Weseloh G, Swoboda B
Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage.
 Osteoarthritis and Cartilage 7:191-202, 1999
- [103] Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR
Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease.
 J Clin Invest 90:2268-2277, 1992
- [104] Roach HI
Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix.
 Bone Miner 19:1-20, 1992
- [105] Robins SP
Functional properties of collagen and elastin.
 Baillière's Clin Rheumatol 2, 1-36, 1988
- [106] Rosenberg L
Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage.
 J Bone Joint Surg Am 53:62-89, 1971
- [107] Roughley PE, Lee ER
Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions.
 Microsc Res Tech 28:385, 1994
- [108] Sandy JD, Plaas AHK
Studies on the hyaluronate binding affinity of newly synthesized proteoglycans in chondrocyte cultures.
 Arch Biochem Biophys 271:300, 1989
- [109] Schenk RK, Eggli PS, Hunzicker EB
Articular cartilage morphology
 In: Articular Cartilage Biochemistry (Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC)
 Raven Press 3-22, 1986
- [110] Schmid TM, Linsenmayer TF
Typ X collagen
 In: Structure and Function of Collagen Types (Mayne R, Burgeson RE)
 Academic Press Inc., London, 223-259, 1987

- [111] Schumacher BL, Block JA, Schmid TM
A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage.
 Arch Biochem Biophys 311:144, 1994
- [112] Smith JB, Bocchieri MH, Sherbin-Allen L, Borofsky M, Abruzzo JL
Occurrence of interleukin-1 in human synovial fluid: detection by RIA bioassay and presence of bioassay inhibiting factors.
 Rheumatol Int 9:53-8, 1989
- [113] Sokoloff L
In vitro culture of joints and articular tissues
 In: The joints and synovial fluid
 United kingdom edition. Academic Press Inc., London, Vol 2, 1-26, 1980
- [114] Soloursh M, Meier S
Effects of cell density on the expression of differentiation by chick embryo chondrocytes
 J. Exp. Zool. 187, 311-322, 1974
- [115] Speckmann EJ, Wittkowski W
Bau und Funktion des menschlichen Körpers
 Bechtermünz Verlag, 1998
- [116] Squires GR, Okouneff S, Ionescu M, Poole AR
The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis.
 Arthritis Rheum 48:1261-1270, 2003
- [117] Stockwell RA
Metabolism of cartilage
 In: Cartilage: Structure, function and biochemistry (Hascall H et al.)
 Academic Press Inc., Orlando, Vol. 1, 253-273
- [118] Sweet MB, Thonar EJ, Immelman AR, Solomon L
Biochemical changes in progressive osteoarthrosis.
 Ann Rheum Dis 36:387-398, 1977
- [119] Swoboda B, Pullig O, Kirsch T, Kladny B, Steinhäuser B, Weseloh G
Increased content of type VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage. Quantification by ELISA.
 J Orthop Res 16:96-9, 1998
- [120] Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE
Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokin production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.
 Arthritis Rheum 44:585-94, 2001

- [121] Thonar EJ, Glant T
Serum keratan sulfate - A marker of predisposition to polyarticular osteoarthritis.
Clin Biochem 25:175, 1992
- [122] Thonar EJ, Lenz ME, Klintworth GK
Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism.
Arthritis Rheum 12:1367-76, 1985
- [123] Till U
Zytokine
In: Pathophysiologie, Pathobiochemie systematisch (Till U)
Uni Med Verlag 172-175, 1999
- [124] Tortella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R
Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins.
Science 284:1664-6, 1999
- [125] Tsai JA, Rong H, Topping O, Matsushita H, Bucht E
Interleukin-1 β upregulates PTHrP-mRNA expression and protein production and decreases TGF- β in normal human osteoblast-like cells.
Calcif Tissue Int 66(5):363-9, 2000
- [126] Uzun H, Tuzun S, Ozaras N, Aydin S, Ozaras R, Dondurmaci S, Tuzun F
The effect of flurbiprofen and tiaprofenic acid on serum cytokine levels of patients with osteoarthritis.
Acta Orthop Scand 72:499-502, 2001
- [127] van den Berg
Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled.
Springer Semin Immunopathol 20:149-64, 1998
- [128] van der Rest M, Rosenberg LC, Oslen BR, Poole AR
Chondrocalcin is identical with the C-telopeptide of type II prokollagen.
Biochem J 237:923, 1986
- [129] Vittur F, Grandolfo M, Fragonas E,
Energy metabolism replicative ability, intracellular calcium concentration, and ionic channels of horse articular chondrocytes.
Exp Cell Res, 210:130, 1994
- [130] von der Mark K
Differentiation, modulation, and dedifferentiation of chondrocytes
Rheumatology 10, 272-315, 1986
- [131] Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z
Role of metalloproteinases in human osteoarthritis.
J Rheumatol Suppl 27:99, 1991

- [132] Wolfsberg TG, Straight PD, Gezena RL
ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloproteinase domain.
Dev Biol 169:378, 1995
- [133] Yasuda T, Poole AR
A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1 mediated pathway.
Arthritis Rheum 46:138-48, 2002
- [134] Zucker S, Buttle DJ, Nicklin MJ, Barrett AJ
The proteolytic activities of chymopapain, papain, and papaya proteinase III.
Biochim Biophys Acta 828:196-204, 1985

8 ANHANG

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Ilgen, Rico
Geburtsdatum, -Ort: 17.09.1976, Schmalkalden

Schulausbildung

09/1983 bis 07/1993 POS Werner Seelenbinder (später Umbenennung in 1. Regelschule), Realschulabschluss
09/1993 bis 06/1996 staatl. berufsbildendes Schulzentrum Jena-Göschwitz, allgemeine Hochschulreife

Wehrersatzdienst

10/1996 bis 11/1997 beim Krankentransportdienst des Klinikums der FSU Jena

Hochschulausbildung

10/1998 bis 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2000 Ablegung der Physikumsprüfung
08/2001 Ablegung des 1. Staatsexamens
09/2003 Ablegung des 2. Staatsexamens
01/2004 Beginn der experimentellen Tätigkeiten für die vorliegende Dissertation
11/2005 Ablegung des 3. Staatsexamens, Approbation als Arzt, Exmatrikulation aus der FSU Jena
seit 11/2005 Fertigstellung der Dissertation

Eisenberg, 15.05.2006

Rico Ilgen

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter sowie ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts habe ich ausschließlich die Unterstützung der folgenden Personen in Anspruch genommen:

Professor Dr. R.-A. Venbrocks

PD Dr. J. Mollenhauer

Professor Dr. R. Kinne

Dr. I. Stonāns

Frau J. Schömburg

Frau Dipl. Biochem. A. Rüttger

Frau C. Mollenhauer

Frau C. Müller

Frau J. Neuwirth M.A.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt.

Eisenberg, 15.05.2006

Rico Ilgen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Forschungslabor am Rudolf Elle Krankenhaus in Eisenberg.

Ich danke dem ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Orthopädie Herrn Professor Dr. R.-A. Venbrocks für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

Weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. J. Mollenhauer für seine kompetente Anleitung, stetige Betreuung und konstruktive Kritik, sowie Herrn Professor Dr. R. Kinne für die Korrektur des Manuskriptes.

Nicht zuletzt gebührt allen Mitarbeitern des Forschungslabors mein Dank für die freundliche und fachkundige Unterstützung sowohl bei den Tätigkeiten während der experimentellen Phase als auch für Vorschläge und Kritiken bei der Erstellung des Manuskriptes.

Rico Ilgen, im Mai 2006